

**QUANTITATIVE AUTORADIOGRAPHISCHE
UNTERSUCHUNG ZUR KINETIK DER
LEBERZELLPROLIFERATION NACH
PARTIELLER HEPATEKTOMIE**

Rainer Wirsching

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551925_0017



AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. M. Eder

QUANTITATIVE AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG
ZUR KINETIK DER LEBERZELLPROLIFERATION NACH
PARTIELLER HEPATEKTOMIE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der
gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Rainer Wirsching
aus Haag
1974

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Hartmut Rabes

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Max Eder

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen

Prüfung: 17.12.1974



Herrn Professor Dr. med. H. Rabes danke ich für die Themenstellung, Anleitung und Beratung bei dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. H.V. Tuczek sowie Frau E. Hajok, Fräulein R. Kerler und Herrn H. Hampe danke ich für ihre Unterstützung.

Die experimentellen Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung des Sonderforschungsbereichs 51 (Teilprojekt 5/Ra - E/9) durchgeführt.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	<u>Seite</u>
ALLGEMEINE VORBEMERKUNGEN	1
EXPERIMENTELLER TEIL	
I. Dauer der Zellzyklusphasen von Hepato- cyten nach Zweidrittel-Hepatektomie	5
1.1. Proliferationsverhalten	5
1.2. Zellzyklusphasen	6
2. Zahl der mitotischen Teilungen nach Zweidrittel-Hepatektomie	8
3. Vorversuch	9
3.1. Zur Versuchsplanung	9
3.2. Material und Methode	9
3.3. Ergebnisse	10
4. Hauptversuch: Material und Methode	10
4.1. Tiermaterial, Operation, Injektion	10
4.2. Histologische Präparate und Autoradiographie	11
4.3. Auswertung der Autoradiogramme	11
4.4. Aufzeichnung der FLM-Kurve	12
5. Bestimmung der Zellzyklusparameter aus der FLM-Kurve	13
6. Ergebnisse	14
6.1. Zur Beurteilung der Ergebnisse	14
6.2. Kurvenverlauf	15
6.3. Zellzyklusphasen	16
7. Diskussion	16
7.1. Zur Versuchsanordnung	16
7.2. Mitotische Teilungen nach Zweidrittel-Hepatektomie	18
7.3. Dauer der Zellzyklusphasen nach Zweidrittel-Hepatektomie	22
7.4. Zum Verlauf der FLM-Kurve	26

II. Dauer der Zellzyklusphasen von Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberlobulus zwischen afferentem und efferentem Gefäßpol nach Zweidrittel-Hepatektomie	41
1. Topik der Leberzellproliferation	41
2. Material und Methode	44
2.1. Versuchsanordnung	
2.2. Versuchsauswertung	
3. Ergebnisse	
3.1. FLM-Kurven der 10 Unterabschnitte des Leberlobulus zwischen P.S. (Portalfeld) und T.H.V. (terminalem Ast der v. hepatica)	
3.2. Zeiten und Veränderungen von G_2 in den 10 Unterabschnitten	47
3.3. Zeiten und Veränderungen von M_{max} in den 10 Unterabschnitten	
3.4. Zeiten und Veränderungen von S in den 10 Unterabschnitten	48
3.5. Zeiten und Veränderungen von G_1 und C in den 10 Unterabschnitten	
4. Diskussion	49
4.1. Vergleich der FLM-Kurven der 10 Lobulus-Unterabschnitte	
4.2. Zu Veränderungen der Zellzyklusparameter in den Unterabschnitten 1 - 10	55
III. Dauer der Mitose und ihrer Stadien im Gesamtparenchym der Leber und in Unterabschnitten des Leberlobulus	71
1. Mitose, Mitosestadien und deren zeitliche Bestimmung	
2. Material und Methode	73
2.1. Versuchsanordnung	
2.2. Versuchsauswertung	74
2.2.1. Auswertung im gesamten Leberlobulus ohne Berücksichtigung der Lage der Mitosen im Läppchen ("Summenkurve")	

	<u>Seite</u>
2.2.2. Auswertung in kleineren Unterabschnitten des Leberlobulus zwischen P.S. und T.H.V. (Topik)	75
2.2.5. Zusammenfassende Darstellung der Dauer der Mitose und ihrer Teilabschnitte in Abhängigkeit von der Lage der Mitosen im Acinus. Vergleich mit den Werten für den gesamten Lobulus	
3. Ergebnisse	76
3.1. FLM-Kurven für Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen für den gesamten Leberlobulus zwischen P.S. und T.H.V. ("Summenkurven")	
3.2. FLM-Kurven für Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen in kleineren Unterabschnitten des Leberlobulus (Topik)	77
3.3. Zeitdauer der Mitose und bestimmter Teilabschnitte in Abhängigkeit von der Lage der Mitosen im Leberlobulus. Vergleich mit den Werten für den gesamten Acinus	79
4. Diskussion	80
4.1. Zur Bestimmungsmethode der mittleren Mitosedauer und ihrer Teilphasen aus FLM-Kurven der einzelnen Mitosestadien	
4.2. Einordnung der gemessenen Zeitintervalle	83
4.2.1. Für den gesamten Leberlobulus ohne Berücksichtigung der Topik	
4.2.2. Für kleine Bereiche des Leberlobulus (Topik)	85
IV. Bedeutung von Background, Silberkornzahl über Mitosen und der Auswertungstechnik bei Bestimmung von Zellzyklusparametern mit der FLM-Methode	92
1. Literaturübersicht	
2. Versuche	97
2.1. Versuchsanordnungen	
2.2. Bestimmung der Größe des Backgrounds in der Autoradiographie	

	<u>Seite</u>
2.3. FLM-Kurven für verschiedene Markierungsschwellen o h n e Berücksichtigung der Lage der Mitosen im Leberlobulus ("Summenkurven")	98
2.4. FLM-Kurven für verschiedene Markierungsschwellen m i t Berücksichtigung der Lage der Mitosen im Leberlobulus (Topik)	99
2.5. FLM-Kurven für Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen in Teilbereichen des Leberlobulus für 3 Silberkörner (SK) als Markierungsschwelle (MS)	99
3. Ergebnisse	100
3.1. Bestimmung der Größe des Backgrounds in der Autoradiographie	
3.1.1. Silberkorndichten und Verlauf der Kurve	
3.1.2. Besprechung	
3.2. FLM-Kurven und Zellzyklusparameter für verschiedene Markierungsschwellen (MS = 1, 2, 3, 4, 5, 8 bzw. 15 SK) o h n e Berücksichtigung der Lage der Mitosen im Leberlobulus ("Summenkurven")	104
3.2.1. Ergebnisse	
3.2.1.1. FLM-Kurven	
3.2.1.2. Zellzyklusphasen	105
3.2.1.3. 1. FLM-Maxima für die Markierungsschwellen 3, 5, 8 und 15 SK	106
3.2.2. Besprechung	107
3.3. FLM-Kurven für verschiedene Markierungsschwellen m i t Berücksichtigung der Lage der Mitosen im Leberlobulus (Topik)	120
3.3.1. Verlauf der FLM-Kurven	
3.3.1.1. FLM-Kurven für 3 Silberkörner (SK) als Markierungsschwelle (MS)	
3.3.1.2. FLM-Kurven für 5 SK als MS	121
3.3.1.3. FLM-Kurven für 8 SK als MS	122
3.3.1.4. FLM-Kurven für 15 SK als MS	122

	<u>Seite</u>
3.3.2. Zellzyklusphasen aus FLM-Kurven für die Markierungsschwellen 3, 5, 8 und 15 Silberkörner in den 10 Unterabschnitten des Leberlobulus	123
3.3.3. Besprechung	125
3.4. FLM-Kurven für Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen in Teilbereichen des Leberlobulus für 3 Silberkörner als Markierungsschwelle	131
3.4.1. Verlauf der FLM-Kurven	
3.4.2. Besprechung	132
4. Besprechung der Auswertungstechnik	133
4.1. Wahl der Markierungsschwelle für Mitosen	
4.2. Zur Erstellung der FLM-Kurven	136
4.3. Zur Entnahme der Zellzyklusparameter aus der FLM-Kurve	137
V. Beeinflussung des Mitoseindex durch die Tagesrhythmik und durch Applikation von ^3H -Thymidin	167
1. Literaturübersicht	
2. Material und Methode	169
2.1. Mitoseindex in den Zonen 1 bis 10 des Leberlobulus (Topik)	
2.1.1. Versuchsanordnung	
2.1.2. Versuchsauswertung	
2.2. Einfluß des Zeitpunkts der Applikation von Hankslösung, inaktivem Thymidin und ^3H -Thymidin und der Tötungszeit auf den Mitoseindex der Hepatocyten 65 Stunden nach Teilhepatektomie	171
2.2.1. Versuchsanordnungen	
2.2.2. Versuchsauswertung	172
3. Ergebnisse	173
3.1. Zonale Verteilung der Mitosen 65 Stunden nach Zweidrittel-Hepatektomie	
3.1.1. Mitoseindex in den Zonen 1 - 10 des Leberlobulus	
3.1.2. Relative Häufigkeit des Mitoseeintritts in verschiedenen Lobulusbereichen	174

	<u>Seite</u>
3.2. Mitoseindex in Abhängigkeit von Injektions- und Tötungszeitpunkt	175
3.2.1. Injektion von Hankslösung	
3.2.2. Injektion von Hankslösung mit inaktivem Thymidin	
3.2.3. Injektion von ^3H -Thymidin	176
3.2.4. Einfluß des Tötungszeitpunkts auf den Mitoseindex	177
4. Diskussion	
4.1. Zonale Verteilung der Mitosen 65 Stunden nach Zweidrittel- Hepatektomie	
4.2. Mitoseindex in Abhängigkeit von Injektions- und Tötungszeitpunkt	181
Zusammenfassung	196
Absatz I	
Absatz II	198
Absatz III	200
Absatz IV	202
Absatz V	205
Literaturverzeichnis	208

A B K Ü R Z U N G E N

DNA	Desoxyribonucleinsäure
FLM	Fraktion markierter Mitosen
³ H-TdR	Tritium markiertes Thymidin
LI	Markierungsindex
MI	Mitoseindex
MS	(Markierungsschwelle) bestimmte, festzulegende Silberkorn- zahl, ab der Zellen als markiert gewertet werden; solche mit weniger oder ohne Silberkörner gelten als unmarkiert
Peak	Gipfel einer markierte-Mitosen-Kurve
P.S.	Portalfeld, Glisson'sches Feld
RNA	Ribonukleinsäure
SK	Silberkörner
SKD	Silberkorndichte
SKZ	Silberkornzahl
TdR	Thymidin
T.H.V.	terminaler Ast der vena hepatica, sogenannte "Zentralvene"

Definitionen von Parametern der Zellkinetik nach
Rajewski et al. (1971) und Lala (1971)

C	=	Zellzyklus
t_C	=	mittlere Zellzyklusdauer
G_1	=	Phase vor der DNA-Synthese (ohne G_0 -Phase)
t_{G_1}	=	mittlere Dauer der G_1 -Phase des Zellzyklus
S	=	DNA-Synthesephase
t_S	=	mittlere Dauer der S-Phase des Zellzyklus
G_2	=	Phase nach der DNA-Synthese
t_{G_2}	=	mittlere Dauer der G_2 -Phase des Zellzyklus
M	=	Mitose
t_M	=	mittlere Dauer der Mitose
G_0	=	Phase proliferativer Ruhe (Lajtha et al. 1962)
n	=	Gesamtzahl der Zellen einer Zellpopulation
n_M	=	Anzahl der in Mitose befindlichen Zellen einer Zellpopulation
n_M^+	=	Anzahl der in der Mitose befind- lichen, 3H -TdR-markierten Zellen einer Zellpopulation
$\frac{n_M^+}{n_M}$	=	Anteil 3H -TdR-markierter Zellen in Mitose an der Gesamtzahl der Zellen in Mitose

ALLGEMEINE VORBEMERKUNGEN

Im Proliferationsverhalten der Gewebe des Organismus können drei Zellpopulationsarten mit unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften abgegrenzt werden:

1. Zellpopulationen mit ständiger rascher Zellerneuerung (Wechselgewebe)
2. Zellpopulationen mit geringer Proliferation und langsamem Zellumsatz (stabile Gewebe)
3. ruhende Zellpopulationen ohne Zellproliferation (statische Gewebe).

Aufgrund solcher Beobachtungen erfolgte durch Bizzozero (1894) eine erste Einteilung der Gewebe in 3 Klassen. Basis war die histologische Bestimmung der Zahl der Zellteilungen in den verschiedenen Geweben. Cowdry unterteilte nach cytologischen Gesichtspunkten in intermitotische und postmitotische Zellen (Cowdry 1942, Cowdry 1953); bei Bildung von je zwei Untergruppen ergaben sich 4 Klassen: vegetativ intermitotische -, differenziert intermitotische -, reversibel postmitotische - und fixiert postmitotische Zellen. Diese Abgrenzung verschiedener Arten von Zellpopulationen war eine Grundlage differenzierter Untersuchungen über die Zellkinetik in den Geweben.

Die Anwendung des Begriffes -Zellkinetik- setzt die Kenntnis von Markierungspunkten d.h. festen Bezugspunkten im Lebensablauf einer Zelle voraus. Dazu kann die Mitose, als physiologischer Gradmesser der Zellproliferation, verwendet werden (Leblond and Stevens 1948), wie dies in früheren Arbeiten zur Zellproliferation geschehen ist (Brues and Marble 1937, Harkness 1952, Côté et al. 1956, Bucher 1963).

Mit stathmokinetischen Methoden, wie der Blockade von Mitosen in der Metaphase durch Colchizin (Evans 1957, Hooper 1961, Bertalanffy 1962) wurden Bestimmungen von Mitoseraten, durch Einbeziehung des Mitoseindex auch von Zellzykluszeiten möglich.

Betrachtet man in der Generationenfolge der Zellen den Zeitraum zwischen zwei aufeinanderfolgenden Mitosen, ergeben sich hieraus weitere Erkenntnisse über die Dynamik der Zellneuerung. Cytophotometrische (Walker and Yates 1952) und autoradiographische Untersuchungen (Howard and Pelc 1953) zeigten, daß die identische Reduplikation der DNA auf einen zeitlich begrenzten Teil der Interphase beschränkt ist. Daraus entwickelte sich der Begriff "Zellzyklus" mit seinen Abschnitten: postmitotische, praesynthetische Ruhephase (G_1), DNA-Synthesephase (S), postsynthetische, praemitotische Ruhephase (G_2) und Mitose (M) (Howard and Pelc 1953). Zugleich wurden die Möglichkeiten zur Untersuchung der Zellproliferation durch Kennzeichnung von DNA mit radioaktiv markierten Nukleinsäure-Vorläufern erweitert (z.B. Howard and Pelc 1953). Einen entscheidenden Fortschritt bedeutete die Verwendung von Tritium-markiertem Thymidin als spezifischem Vorläufer der DNA (Reichard and Estborn 1951, Friedkin 1956, Hughes 1958, Wimber 1963), da die Aufnahme in die Zelle auf die S-Phase beschränkt ist (Schultze and Oehlert 1960, Stone et al. 1965). Der Einbau von 3-H-TdR als Folge metabolischer DNA-Synthese ist hier als Ausnahme anzusehen (z.B. Viola- Magni 1966, Pelc and Viola- Magni 1969). Die sehr energiearme β -Strahlung von 3-H-TdR zeigt nach Einbau der Substanz in die DNA Silberkörner fast ausschließlich über dem Zellkern (Schultze 1968, Lala 1971) und erleichtert so die Abgrenzung der Markierung. Wegen seiner kurzen Verfügbarkeitszeit im Organismus (Hughes 1958, Quastler and Sherman 1959, Koburg und Maurer 1962, Wagoner et al. 1964, Staroscik et al. 1964, Chang and Looney 1965), läßt sich zudem eine nahezu ideale Pulsmarkierung von Zellen in der S-Phase durchführen. Derartig markierte Populationen können in ihrem Lauf durch die Mitose und den weiteren Zyklus verfolgt werden. So gibt die Bestimmung des Markierungsindex (LI) in Abständen nach Vorläufer-Injektion Aufschluß über die Dauer von

G_2 und S (Wimber 1963), zudem noch über die Orte der DNA-Synthese. Mit Silberkornzählungen über Zellkernen oder Mitosen und Beobachtung der abnehmenden Markierungsdichte im Lauf der Zeit (Stanners and Till 1960, Young 1962, Koburg 1963, Wimber 1967) lassen sich bei asynchronen Zellsystemen Phasenlängen ermitteln. Dauermarkierungstechniken oder wiederholte 3-H-TdR Injektionen werden zur Feststellung aller tatsächlich proliferierenden Zellen wie zur Bestimmung von Zellzyklusparametern verwendet (Maloney et al. 1962, Wimber 1963, Lala 1971, Schultze et al. 1972). Doppelmarkierungen mit 3-H-TdR und 14-C-TdR sind vor allem zur genauen Analyse der DNA-Synthesephase geeignet (Pilgrim und Maurer 1962, Wimber 1963, Wimber and Quastler 1963, Wegener et al. 1964, Pilgrim und Maurer 1965). Dagegen bleibt eine direkte Beobachtung einzelner Zellen zur Messung von Phasendauer und Zellzyklusabläufen, wie vor allem mit der Mikrokinematographie (Sisken and Morasca 1965, Sisken et al. 1965, Sisken 1968), in ihrer Anwendung hauptsächlich auf Zellkulturen beschränkt. Wohl am meisten wird für zellkinetische Untersuchungen das Prozent-markierte-Mitosen (FLM)-Verfahren (Quastler and Sherman 1959, Painter and Drew 1959) herangezogen. Es gestattet die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Zellzyklusparameter und ist darüber hinaus, im Vergleich zu anderen Methoden, vermutlich am genauesten (Steel 1972).

Zur Anwendung dieses FLM-Verfahrens geeignet sind proliferierende Zellsysteme wie Zellkulturen, Tumoren, Epithelien, Mesenchymzellen und unter bestimmten Voraussetzungen auch die adulte Leber.

In der unbehandelten, ausgewachsenen Leber, mit ihren reversibel postmitotischen Zellen (Cowdry 1942, Cowdry 1953) ist der Zellumsatz nur gering. Mitosen (Schultze and Oehlert 1960, Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Stöcker und Altmann 1964, Stöcker und Heine 1965 b, Bucher 1967) und DNA-synthesisierende Zellen (Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Stöcker

und Altmann 1964, Stöcker 1966, Fabrikant 1968) sind selten. Dadurch wird die Anwendung des FLM-Verfahrens zur Bestimmung der Zellzyklusphasen nahezu unmöglich. Nach einem adäquaten Reiz wie der von Ponfick (1889) zuerst beschriebenen experimentellen Teilhepatektomie kann eine Proliferation induziert werden. Während dieser Proliferationswelle sind kinetische Untersuchungen möglich, da im Lebergewebe eine größere Zahl sich teilender Zellen vorliegt.

Mit diesem Versuchsmodell sollen hier, am Beispiel der Ratte, im einzelnen folgende Fragen untersucht werden:

- I. Dauer der Zellzyklusphasen von Hepatocyten nach Zweidrittel-Hepatektomie.
- II. Dauer der Zellzyklusphasen von Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberlobulus zwischen afferentem und efferentem Gefäßpol nach Zweidrittel-Hepatektomie.
- III. Dauer der Mitose und ihrer Stadien im Gesamtparenchym der Leber und in Unterabschnitten des Leberlobulus.
- IV. Bedeutung von Background, Silberkornzahl über Mitosen und der Auswertungstechnik bei Bestimmung von Zellzyklusparametern mit der FLM-Methode.
- V. Beeinflussung des MI durch die Tagesrhythmik und durch Applikation von 3-H-Thymidin.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. DAUER DER ZELLYKLUSPHASEN VON HEPATOCYTEN NACH ZWEIDRITTEL-HEPATEKTOMIE

1.1. Proliferationsverhalten

In der ruhenden Leber ausgewachsener Ratten befinden sich nur sehr wenige Parenchymkerne in der DNA-Synthese (Schultze and Oehlert 1960, Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Stöcker und Altmann 1964, Stöcker 1966, Fabrikant 1968) (0,2 - 0,4%) und der Mitose (Brues and Marble 1957, Schultze and Oehlert 1960, Oehlert et al. 1962, Grisham 1962, Post et al. 1963, Stöcker und Altmann 1964, Bucher 1967, Fabrikant 1967 c, Grundmann und Seidel 1969) (0,025 - 0,1%). Nach einer standardisierten Zweidrittel-Hepatektomie (Higgins and Anderson 1951) folgt eine Proliferation im gesamten Leberparenchym (Stöcker 1966, Fabrikant 1968). In ihrem Verlauf werden der LI und MI bis auf das 100-300fache des Ausgangswertes erhöht (Brues and Marble 1957, Cater et al. 1956, Grundmann und Bach 1960, Oehlert et al. 1962).

Etwa 15 bis 18 Stunden post operationem beginnt eine starke Zunahme DNA-synthetisierender Zellen (Grisham 1960, Grisham 1962, Stöcker 1966, Fabrikant 1967 d, Grisham 1969, Rabes and Brändle 1969, Fabrikant 1969, Tuczec und Rabes 1973) mit einem ersten Gipfel bei 24-28 Std. (Grisham 1960, Fabrikant 1967 d, Grisham 1969, Rabes and Brändle 1969, Fabrikant 1969). Anstieg und Maximum von Mitosen folgen rund 6-9 Std. nach den markierten Kernen (Grisham 1960, Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Stöcker 1966, Fabrikant 1967 d, Fabrikant 1966, Fabrikant 1969, Grisham 1969), wobei der Gipfel zwischen 30 und 36 Std. liegt.

Einige Autoren fanden noch einen kleinen 2. Synthesegipfel etwa 48-60 Std. nach OP (Cater et al. 1956, Rabes et al. 1965, Rabes 1967); ein entsprechender 2. Mitosegipfel ist ab 52 Std. feststellbar (Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1967 d,

Fabrikant 1968). Auch danach bleiben LJ und MI noch längere Zeit erhöht (Fabrikant 1967 d, Fabrikant 1968); sie erreichen erst nach 2-3 Wochen wieder die Normalwerte. Es wurde zusätzlich über einen weiteren, kleinen Proliferationsgipfel am 9.-11. Tag post op. berichtet (Günther et al. 1968).

Der Ablauf der Proliferation wird begleitet von charakteristischen morphologischen Veränderungen in Kern und Cytoplasmastrukturen (Grundmann und Bach 1960, Oehlert et al. 1962, Stöcker et al. 1967, Grundmann und Seidel 1969). Der Ersatz des Lebergewebes geht sehr rasch voran: schon nach 7-10 Tagen ist das Ausgangsgewicht wieder erreicht (Bucher 1967, Grundmann und Seidel 1969). Dabei hängen Intensität und zeitlicher Verlauf der Regeneration stark von der Menge des resezierten Gewebes (Bucher und Swaffield 1964, Bucher 1967, Heine und Stöcker 1968 a, Tuzek und Rabes 1971), wie auch vom Alter ab (Bucher et al. 1964, Bucher und Swaffield 1964, Bucher 1967, Stöcker 1968 a, Heine und Stöcker 1968 b, Klinge 1968). Mit dem Alter wechselt auch die Größe des "proliferating-pool" bzw. der "growth fraction" (Wachstumsfraktion) (Stöcker und Heine 1971 a, Stöcker und Heine 1971 b, Stöcker et al. 1972).

1.2. Zellzyklusphasen

Während des physiologischen Ersatzwachstums beträgt die Dauer des Zellzyklus mehrere hundert Tage oder gar Jahre (Stöcker und Altmann 1964). Ein Großteil der Hepatocyten dürfte damit ebenso lange leben wie das Tier (Post and Hoffman 1964). Den weitaus größten Zeitabschnitt nimmt davon die postmitotische Ruhephase G_1 ein, während S, G_2 und M vergleichsweise sehr kurz sind (Sisken 1968). Der Proliferationsmodus der Parenchymzellen, gemessen an der Zeitdauer von Teilphasen des Zellzyklus (Stöcker 1968 b), zeigt etwa 18-20 Std. nach einer Zweidrittel-Hepatektomie eine Umschal-

tung (Stöcker und Bach 1965, Stöcker 1966). Der Zellzyklus wird auf Stunden verkürzt, wobei die Verminderung besonders G_1 betrifft (Grisham 1969). Die DNA-Syntheserate steigt um den Faktor 2, d.h. die Dauer von S wird halbiert. G_2 und M sind deutlich verkürzt (Stöcker und Heine 1965 b, Stöcker 1966, Stöcker 1968 a, Stöcker und Heine 1971 b, Stöcker et al. 1972). Der Modus ist damit vergleichbar dem schnell proliferierender Zellsysteme. Die mittlere Dauer der S-Phase beträgt bei diesen zwischen 7,5 - 8,5 Stunden (Looney 1960, Edwards and Koch 1964, Stöcker 1966, Stöcker und Pfeifer 1967, Fabrikant 1968). Dieser Zyklusabschnitt bleibt, zusammen mit G_2 und M, auch bei Zellarten mit insgesamt sehr unterschiedlicher Zellzykluszeit relativ ähnlich bzw. vergleichbar (Post et al. 1963, Wegener et al. 1964, Pilgrim und Maurer 1965, Prescott 1968, Grisham 1969, Fabrikant 1969). Die DNA-Synthesephase beträgt gleichbleibend sowohl vor wie nach einer Teilhepatektomie, die 6-8fache Zeit der Mitose (Grisham 1962, Stöcker und Altmann 1964, Stöcker et al. 1964); dabei wird t_M post operationem etwa mit 1 Stunde angegeben (Stöcker und Pfeifer 1967).

Die Umschaltung des Proliferationsmodus erfolgt erst von einer bestimmten Reizgröße ab, etwa der Eindrittel-Hepatektomie (Heine und Stöcker 1968 a). Danach ist auch in der senilen Rattenleber noch eine erneute Umschaltung vom langsamen auf den schnellen Zyklusablauf möglich (Heine und Stöcker 1968 b, Heine und Stöcker 1970). Physiologisch findet sich diese Änderung des Proliferationsmodus im Laufe der Entwicklung vom postnatalen zum ausgewachsenen Organ (Altmann 1966, Stöcker 1966).

Der gesamte Zellzyklus der Hepatozyten verlangsamt sich erheblich mit steigendem Lebensalter (Post and Hoffman 1964, Post and Hoffman 1965 b, Stöcker und Heine 1965 b, Grisham 1969). So durchlaufen die Zellen bei wachsenden Ratten und unbehandelter Leber während 48 Stunden anfangs im Alter von

einem Tag 3, im Alter von 8 Wochen jedoch nur noch 1 Zellzyklus (Post et al. 1963, Grisham 1969). Noch deutlicher werden die Zeitunterschiede beim Vergleich dieses schnellen postnatalen Organwachstums mit den erheblich verzögerten zellkinetischen Vorgängen beim physiologischen Ersatzwachstum (Post et al. 1963, Post and Hoffman 1964, Stöcker und Heine 1965 b, Stöcker und Pfeifer 1967).

2. Zahl der mitotischen Teilungen nach Zweidrittel-Hepatektomie

Ob der einzelne Hepatocyt post operationem aus einer G_0 -Phase (= Population potentiell proliferierender Zellen (Lajtha et al. 1962, Quastler 1963) in G_1 eintritt, den Zellzyklus einmal durchläuft, und dann wieder in eine Ruhephase G_0 zurücktritt, oder ob er, einmal in den Zellzyklus eingetreten, mehrere Mitosen in rascher Folge hintereinander vollzieht, ist unterschiedlich beantwortet worden. Einerseits wird vermutet, daß sich nach Hepatektomie die meisten Zellen einmal, einige aber auch mehrfach teilen (Stöcker und Pfeifer 1967, Fabrikant 1967 a, Fabrikant 1968, Grisham 1969, Rabes und Tuzek 1970); für die vergleichbar proliferierende Leber unbehandelter juveniler Tiere werden mehrere Zellzyklusabläufe in rascher Folge beschrieben (Post et al. 1963, Post and Hoffman 1964). Dagegen konnten andere Untersucher bei unbehandelten, juvenilen Ratten (Schultze and Maurer 1972), wie auch bei ausgewachsenen Ratten nach Teilhepatektomie (Stöcker und Pfeifer 1967) innerhalb einer längeren Beobachtungszeit kein mehrfaches Durchlaufen des Mitosezyklus beobachten. Der Versuch, diese Frage zu klären und die Bestimmung der Zellzyklusparameter für die regenerierende Leber der eben ausgewachsenen Ratte soll Ziel der folgenden Untersuchung sein.

3. Vorversuch

3.1. Zur Versuchsplanung

Bei Klärung der Fragestellung mit dem FLM-Verfahren (Quastler and Sherman 1959) bedarf es einer ausreichend großen Zahl gut auswertbarer Mitosen (Lipkin 1971). Dazu sollte, um für die gesamte Leber eine sichere Aussage machen zu können, die Mitoseaktivität in allen Bereichen zwischen Portalfeld (P.S.) und V. hepatica (T.H.V.) möglichst ähnlich sein. Damit für den Fall längerer Zellzykluszeiten bei den untersuchten Hepatocyten auch ein zweites Durchlaufen der Mitose erfaßt werden kann, muß der Beobachtungszeitraum (von Hepatektomie bis Tötung) möglichst lang gewählt werden.

3.2. Material und Methode

Zur Festlegung dieses günstigsten Zeitabschnittes wurden bei insgesamt 23 Wistarratten AF/Han von 200-210 g Gewicht, Zweidrittel-Hepatektomien (nach Higgins und Anderson 1931) durchgeführt und in verschiedenen Intervallen zwischen 24 und 72 Std. post operationem jeweils 2-3 Tiere getötet. Von den entnommenen Lebern wurden auf übliche Art histologische Schnitte angefertigt. Dann wurden mit einem Okularzählraster bei 625-facher Vergrößerung der Leberlobulus zwischen P.S. und T.H.V. in 10 flächengleiche Rechtecke unterteilt und in diesen, jeweils gesondert, die in der Mitose befindlichen Hepatocyten gezählt (vgl. I. 4.). Nach Bestimmung der Zelldichte in den einzelnen Rasterfeldern folgte die Berechnung der Mitosenhäufigkeit (MI) für jeden der 10 Unterabschnitte und für den gesamten Bereich zwischen P.S. und T.H.V.

3.3. Ergebnisse

Der MI im gesamten Lobulus (Abb. 1) zeigte bei Tötung nach ca. 20 Std. einen raschen Anstieg, und ein erstes, größtes Maximum bei 28-30 Stunden; nach allmählichem Absinken trat ein zweiter, kleinerer Gipfel zwischen 60-68 Stunden auf, dessen höchste Mitosewerte etwa bei 65 Stunden lagen. Die gesonderte Mitosezählung in kleinen Abschnitten des Leberlobulus entlang der Strecke P.S. bis T.H.V. ergab 30 Std. nach Hep., beim höchsten MI-Gipfel, Teilungsfiguren fast ausschließlich in Bereichen in der Nähe des Portalfeldes; um 65 Std. war jedoch deren Verteilung im ganzen Läppchen annähernd gleichmäßig. Damit schien dieser Zeitpunkt für die weiteren Versuche gut geeignet.

4. Hauptversuch: Material und Methode

4.1. Tiermaterial, Operation, Injektion

55 männliche Wistarratten (AF/Han) von $200,7 \text{ g} \pm 9,6 \text{ g}$ Körpergewicht und einem Alter von ca. 8 Wochen, erhielten Futter (Altromin-Standarddiät) und Wasser ad libitum. Zwischen 22 und 4 Uhr erfolgte eine typische Zweidrittel-Hepatektomie (Higgins and Anderson 1931) mit Entfernung des medialen und sinistro-lateralen Lappens. Jeweils ein Tier erhielt zur 15., 16., 17., ... bis 59. Stunde post operationem in 60-minütigem, von der 60. bis 64 1/2 Std. in 30-minütigem Abstand $0,8 \mu\text{Ci/g}$ $^3\text{H-TdR}$ (spez. Akt. $5,0 \text{ Ci/mM}$, Radiochemical Centre Amersham) in $0,8 \text{ ml}$ Salzlösung nach Hanks intraperitoneal injiziert. 65 Std. nach der Hepatektomie wurden alle Tiere durch Nackenschlag getötet.

4.2. Histologische Präparate und Autoradiographie

Die Lebern wurden entnommen, in ca. 3 mm dicke Scheiben aufgeschnitten und in 10% Formol mit Zusatz von 0,1 mg/ml inaktivem Thymidin fixiert. Darauf folgte repräsentativ für das Restorgan vom Lobus dexter lateralis nach Paraffineinbettung die Anfertigung histologischer Schnitte von 4 µm Dicke. Jeweils nur jeder 3. oder 4. Schnitt wurde bearbeitet; die dazwischen liegenden wurden verworfen, um nicht in 2 aufeinanderfolgenden Schnitten die gleichen Zellen auszuwerten. Autoradiogramme wurden mit Emulsion (K 2, Ilford) nach der Dipping-Methode hergestellt (Expositionszeit 18 Tage, bei 4°C, Entwicklung 12 Min bei 21°C) und anschließend mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Alle Objektträger wurden mit Codes versehen und im Blindversuch ausgewertet.

4.3. Auswertung der Autoradiogramme

Bei 100-facher Vergrößerung (Objektiv 10-fach, Großfeldokular 10-fach) wurden Leberacini aufgesucht (vgl. Rappaport 1965), wo Portalfeld (P.S.) und ein ihm zuzuordnender terminaler Ast der Vena hepatica (T.H.V.), (die sogenannte "Zentralvene") gut im Schnitt getroffen waren. In diesem Bereich wurden bei 625-facher Vergrößerung mit einem Okularraster Quadrate der Kantenlänge 42,6 µm ins Gesichtsfeld eingespiegelt. Damit ließen sich vom Rand des P.S. in gerader Linie bis zur T.H.V. Parenchymstreifen einer Breite von 3 Quadraten (127,8 µm) und einer Länge von 9-12 Quadraten (383,4 - 511,2 µm) in Abschnitte unterteilen. Um Leberlobuli verschiedener Länge miteinander vergleichen und in Beziehung bringen zu können, wurden alle 9-12 Quadrate zählenden Streifen auf einen Standardlobulus von 10 solchen Abschnitten projiziert (Abb. 3). Diese rechteckigen Bezirke erhielten, von der T.H.V. bis zum P.S., die Nummern 1 - 10 (siehe Abb. 2).

Die so gegliederten Läppchen eigneten sich zur genauen topischen Zuordnung in Teilung befindlicher Parenchymzellen und zur Bestimmung des Mitosestadiums und der Markierung. An allen ausgewerteten Mitosen wurden bei 1250-facher Vergrößerung (Objektiv 100 x, Tubusfaktor 1,25 x, Großfeldokular 10-fach), die über den Chromosomen gelegenen Silberkörner gezählt. Die Befunde wurden für jeden Zeitpunkt nach ^3H -TdR-Injektion in gesonderte Ergebnislisten übertragen. Darin wurden jeweils alle Mitosen nach Lokalisation, Teilungsstadium und bestimmter Silberkornzahl für jedes Tier zusammengefaßt (Abb. 4). Die Gruppierung nach SK-Dichte erfolgte für 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und mehr, und 15 und mehr Silberkörner. Pro Tier wurden zwischen 250-850, insgesamt, bei allen Tieren zusammen, 28 500 Mitosen differenziert.

4.4. Aufzeichnung der FLM-Kurve

Von allen Tieren, denen zwischen 0,5 und 50 Stunden vor Tötung ^3H -TdR injiziert worden war, wurden in jeder der 10 Lobuluszonen die Gesamtzahl der Mitosen und deren Einteilung nach Silberkornzahlen bestimmt. Nach Festlegung einer Markierungsschwelle (MS) wertete man Teilungsfiguren mit geringerer Silberkornzahl, oder ohne SK, als unmarkiert, alle anderen als markiert. Dann wurde nach dem Verfahren von Quastler und Sherman (1959) die Fraktion markierter Mitosen als Funktion der Zeit nach ^3H -TdR-Injektion aufgetragen.

Das darauffolgende Zeichnen einer FLM-Kurve durch die ermittelten Punkte ist oft durch die nahezu immer mehr oder weniger stark vorhandene Streuung der Einzelwerte erschwert. Deswegen wurden hier zeitlich nahe beieinanderliegende Punkte in folgender Weise zueinander in Beziehung gesetzt: Fortlaufend über den gesamten Versuchszeitraum wurden immer

3 aufeinanderfolgende Ergebnispunkte als die Eckpunkte eines Dreiecks angesehen und dessen Schwerpunkt jeweils graphisch bestimmt. Jedem einzelnen Versuchszeitpunkt zwischen 1/2 und 50 Std. nach $^3\text{H-TdR}$ konnte ein solcher Hilfspunkt (H.P.) zugeordnet werden. Geleitet von der Lage dieser Hilfspunkte wurde dann eine "geglättete", an alle Ausgangswerte weitgehendst gleichermaßen angepaßte Kurve durchgezeichnet. Meist befanden sich die H.P. in unmittelbarer Nähe dieser Linie, hatten aber teilweise, vor allem bei langen Versuchszeiten auch geringen Abstand dazu. Darum wurde für alle Punkte nochmals geprüft, ob die Kurve trotzdem in einer optimalen, mittleren Lage verlief: Die Entfernungen der H.P. zur Kurve wurden gemessen (jeweils innerhalb eines kleineren Zeitraums). War deren Summe zu beiden Seiten der Kurve gleich, war damit die Ideallage gefunden. Bestand jedoch eine Differenz, so wurde der Verlauf der bereits gezeichneten Kurve entsprechend korrigiert.

5. Bestimmung der Zellzyklusparameter aus der FLM-Kurve

Die Bezeichnung der zellkinetischen Parameter erfolgte in Anlehnung an Rajewsky et al. (1971) und Lala (1971).

Zur Bestimmung von G_2 und M wurde der ansteigende Schenkel des ersten FLM-Gipfels geradlinig nach unten bis zum Schnitt mit der Abszisse und nach oben bis zum Erreichen von $\frac{n_M^+}{n_M}$ gleich 1,0 verlängert. $t_{G_2 \min}$ ist dann der

Zeitraum von Null bis zum unteren Schnittpunkt mit der Abszisse. Daneben wurde noch der Zeitpunkt des ersten Auftretens markierter Mitosen abgelesen und mit $t_{G_2 \min \text{ abs.}}$

bezeichnet. Mit der Distanz von Null bis zu dem Lot vom oberen Schnittpunkt auf die Abszisse erhält man die Dauer von $(t_{G_2} + t_M)_{\max}$. Daraus ergibt sich durch Subtraktion

von $t_{G_2 \min}$ der Wert für $t_{M \max}$.

Die mittlere Dauer von S ($= t_S$) wurde aus dem Zeitintervall zweier Punkte mit $\frac{n_M^+}{n_M}$ gleich 0,5 am an- und absteigendem

Kurvenschkel des 1. Maximums ermittelt. Die zugehörige Standardabweichung wurde graphisch nach der von Takahashi (1966) angegebenen Methode bestimmt.

Für die Bestimmung der Zellzykluszeit wurden verschiedene Methoden vergleichend verwendet: t_C wurde gemessen

- 1) vom ersten bis zum nächstfolgenden Gipfel der FLM-Kurve.
- 2) aus dem Zeitabstand zweier entsprechender Kurvenpunkte am Beginn des ansteigenden Schenkels des ersten und zweiten Maximums, und
- 3) als Zeitintervall zwischen je einem Punkt auf diesen Schenkeln in halber Höhe des ersten und des zweiten Gipfels. Die postmitotische, praesynthetische Ruhephase G_1 ließ sich dann abschätzen aus der Differenz zwischen t_C und der Summe ($t_{G_2 \min} + t_{M \max} + t_S$).

6. Ergebnisse

6.1. Zur Beurteilung der Ergebnisse

Im nachfolgenden Abschnitt wurde zunächst eine "Summen"-FLM-Kurve ausgewertet. Dazu wurden die in allen 10 Unterabschnitten des Leberlobulus gefundenen Teilungsfiguren zusammengefaßt. Die Topik, d.h. die unterschiedliche Lage im Läppchen und das Mitosestadium sind nicht berücksichtigt. Als markiert gewertet wurden Mitosen mit 8 und mehr SK über den Chromosomen, die übrigen mit weniger oder ohne SK galten als unmarkiert ($MS = 8 \text{ SK}$). Das Auftragen der Werte und die Zeichnung der FLM-Kurve erfolgte wie unter I.4.4. beschrieben.

6.2. Kurvenverlauf

Im untersuchten Zeitraum zwischen 1/2 und 50 Std. nach ^3H -TdR-Applikation treten zwei deutliche, weit auseinanderliegende FLM-Maxima auf, wobei das erste hoch und steil, das zweite wesentlich flacher und niedriger ist (Abb. 5). Vom Beginn beim Zeitpunkt 0,5 Std. nach Injektion von ^3H -TdR verläuft die Kurve für kurze Zeit auf der Abszisse. Ab 2,5 Std. zeigt sich eine erste leichte Anhebung, bis nach 3 Std. etwa 4 von 100 Mitosen markiert sind. Danach folgt ein steiler, geradliniger Anstieg mit einem Steigungswinkel von $77,8^\circ$. Zunächst liegen hier alle Einzelpunkte genau auf der Kurve. Nach etwa 8 Std. ist die Mitte des abgerundeten, ca. 4,5 Std. breiten Gipfels erreicht. Die Fraktion markierter Mitosen beträgt hier 0,93. Anschließend fällt die Kurve wieder und geht in den absteigendem, etwas flacheren Schenkel ($76,5^\circ$) über. Nach einer längeren Geraden biegt er mit einer kleinen Krümmung bei etwa 15-16 Std. (nach ^3H -TdR) parallel zur Abszisse ein. Im Gipfelbereich und besonders gegen Ende des absteigenden Schenkels bestehen zwischen Einzelwerten und gezeichnetem FLM-Kurvenverlauf geringfügige Streuungen.

Ab etwa 16 Std. nach ^3H -TdR-Injektion verläuft die Kurve längere Zeit sehr dicht über der Abszisse. Bei 29 bis etwa 32 Std. zeigt sich eine kleine, flache Welle, wo 6-7 von 100 Mitosen markiert sind. In unmittelbarem Anschluß daran beginnt bei ca. 35 Std. der Anstieg zum zweiten FLM-Maximum. Im Vergleich mit dem ersten ist dessen ansteigender Schenkel viel flacher (ca. 49°). Am Gipfelpunkt, bei rund 41,5 Std., erreicht diese zweite Welle markierter Mitosen mit $\frac{n_{M^+}}{n_M}$ bis zu 0,31 nur etwa 1/3 der Höhe der ersten. Dagegen ist die Basis dieses Peaks leicht verbreitert. Der dem 2. Gipfel folgende, erneute Abfall der Kurve ist ebenso flach wie der Anstieg. Er endet 50 Std. nach ^3H -TdR, wo keine

markierten Mitosen mehr auftreten. Im Verlauf dieses 2. FLM-Gipfels wird die Streuung der einzelnen Punkte zu der in Mittellage befindlichen Kurve deutlicher, besonders im Vergleich zu früheren Zeitabschnitten.

6.3. Zellzyklusphasen

Mit Hilfe der unter I.5. angegebenen Verfahren wurden aus dieser FLM-Kurve die Zellzyklusparameter für die Gesamt-Leber bestimmt.

Für die postsynthetische Phase G_2 ergibt sich: $t_{G_2 \text{ min}} = 3,08$ Std. bzw. zum Vergleich,

$t_{G_2 \text{ min abs.}} = 2,5$ Std.; als Mitosedauer erhält man ein $t_{M \text{ max}}$ von 2,18 Std. für t_S , die mittlere Dauer der DNS-Synthesephase, läßt sich eine Zeit von 7,65 Std. ableiten. Die dazugehörige Standardabweichung beträgt $\pm 1,54$ Std. Die Zellzyklusdauer wurde nach 5 Methoden bestimmt: Gemessen von Peak zu Peak erhält man t_C zu 55,60 Std., zwischen jeweils den halben Höhen ein t_C von 52,95 Std., und zwischen dem Beginn der ansteigenden Schenkel von 52,60 Std. Daraus ergibt sich ein Mittelwert von 53 Stunden für die Zellzyklusdauer. Bei bekanntem t_C wurde dann ein t_{G_1} von rund 20 Std. berechnet.

7. Diskussion

7.1. Zur Versuchsanordnung

Die Untersuchung der mitotischen Teilungen der einzelnen Leberzelle nach Teilhepatektomie brachte unterschiedliche Ergebnisse. So fanden Stöcker (1966) und Stöcker und Pfeifer (1967) bei ausgewachsenen Ratten in der FLM-Kurve während 38-stündiger Beobachtung kein 2. Maximum markierter Mitosen.

Auch Fabrikant (1967 a, 1968) erhielt (nach Hepatektomie) bei etwa 100 g schweren Tieren bis 24 Stunden Versuchszeit keinen erneuten Gipfel. Dagegen wird bis 48 Stunden bei 8 Wochen alten Tieren von zwei (Post and Hoffman 1964, Grisham 1969), bei 3 Wochen alten Ratten von drei Zellzyklusbereichen (Post, Huang and Hoffman 1963, Post and Hoffman 1964) ohne Hepatektomie berichtet. Diese Befunde konnten in einem identischen Versuch nicht bestätigt werden (Schultze und Maurer 1972) (bei 54 Stunden Beobachtung).

Trotz Fehlen eines direkten Nachweises muß eine erneute mitotische Teilung mindestens einiger Zellen angenommen werden, vor allem wegen Auftretens markierter Mitosen mit stark verringerter Silberkornzahl längere Zeit nach Injektion von $^3\text{H-TdR}$ (Fabrikant 1967 a, Fabrikant 1967 c, Stöcker und Pfeifer 1967, Fabrikant 1968). Daher wurde in den vorliegenden Versuchen ein langer Beobachtungszeitraum von 65 Stunden zwischen Teilhepatektomie und Tötung der Tiere gewählt, um eine zweite FLM-Welle zu erfassen. Der Zeitpunkt der Verabreichung des markierten DNA-Vorläufers wurde variiert. In vielen anderen Untersuchungen hat man den Injektionszeitpunkt fixiert und das Intervall bis zur Tötung variiert. Damit ändert sich mit der Entfernung von der Hepatektomie die Proliferationsintensität. Eine Änderung der Dauer der Zellzyklusphasen mit dem Zeitpunkt der Messung post operationem wäre in einer solchen Versuchsanordnung denkbar, wie für G_2 und M angegeben (Stöcker und Bach 1965, Stöcker und Pfeifer 1967). Gleiche Überlebenszeit bei allen Versuchstieren schließt hier diese Möglichkeit aus.

Die Vorläuferinjektion wurde erst 15 Stunden nach Zweidrittel-Hepatektomie begonnen, weil zu früheren Zeitpunkten DNA-synthetisierende Zellen selten sind (Grisham 1962, Stöcker und Altmann 1964, Stöcker 1966, Fabrikant 1968) und die Flußrate in das S-Kompartiment (Tager and Rabes 1973) so niedrig liegt, daß davon nur sehr wenige Hepatozyten $^3\text{H-TdR}$ -markiert werden könnten. Bei früheren Injektionszeitpunkten als 15 Std. würde man später keine markierten Mitosen vorfinden. (Bei Stöcker und Pfeifer (1967) wurde dennoch zu

solch frühen Zeiten nach Operation $^3\text{H-TdR}$ injiziert; es konnte also wohl gar keine 2. FLM-Welle auftreten). Die Anwendung der FLM-Methode wird damit erst zu Zeiten nach diesem DNA-Syntheseanstieg sinnvoll.

Die hier verwendeten eben ausgewachsenen Ratten von 200 g haben unbehandelt schon konstante Werte des LI und MI in der Leber erreicht (Stöcker 1966, Stöcker 1968 a, Grisham 1969, Stöcker et al. 1972). Das Zellsystem befindet sich angenähert in einem "steady state" mit konstanter Häufigkeitsverteilung über die Phasen des Zellzyklus. Durch die Teilhepatektomie wird das System nun partiell synchronisiert (Altmann 1966, Fabrikant 1968, Fabrikant 1969, Grundmann und Seidel 1969), erkennbar am deutlich wellenförmigen Verlauf von LI und MI. Eine scharfe Synchronisation steht im Widerspruch zur Anwendungsmöglichkeit des FLM-Verfahrens (Quastler und Sherman 1959). Eine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch partielle Synchronisation wird jedoch als gering erachtet; Wimber (1963) meint, sie ist "kein ernster Nachteil"; zudem bezieht es sich als "relatives Verfahren" (Stöcker 1966) nur auf Verhältniszahlen. Eine mögliche Störung durch die primäre Teilsynchronisation ist hier weitgehend ausgeschaltet, da die kurz nach Hepatektomie auftretende, sehr ausgeprägte, mehr oder weniger transitorische Proliferationswelle (Grundmann und Seidel 1969) 65 Std. nach der Operation schon stark vermindert ist (Stöcker 1966, Fabrikant 1968, Günther et al. 1968, Klinge und Mathyl 1969).

7.2. Mitotische Teilungen nach Zweidrittel-Hepatektomie

Im Versuchszeitraum zwischen 0 und 50 Stunden nach $^3\text{H-TdR}$ -Verabreichung zeigen sich deutlich 2 Maxima markierter Mitosen. Daraus geht eindeutig hervor, daß im Anschluß an eine Zweidrittel-Hepatektomie zumindest ein Teil der Hepato-

cyten nach der ersten noch eine zweite Mitose durchläuft; die Dauer der praesynthetischen Phase G_1 des 2. Zellzyklus ist dabei dem entsprechenden Zeitabschnitt von Operation bis zum ersten DNA-Synthese-Gipfel (Grisham 1960, Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Edwards and Koch 1964, Stöcker 1966, Rabes 1967, Fabrikant 1968) vergleichbar. Die Regeneration wird nach Teilhepatektomie also nicht ausschließlich von Zellen getragen, die nach einem einzigen Zellzyklus wieder in eine Phase proliferativer Ruhe (G_0) (Lajtha et al. 1962, Quastler 1963) zurücktreten, oder solchen, die erst viel später nach einem sehr langen G_1 eine weitere Teilung vollziehen. Etliche Zellen behalten post operationem ihren schnellen Proliferationsmodus noch über einen oder mehrere Zellzyklen bei.

Der zweite Gipfel der vorliegenden FLM-Kurve zeigt nicht nur eine erheblich geringere Höhe als der erste, auch die Fläche ist kleiner. Geringere Höhe eines zweiten FLM-Maximums kann durch die bei Zellsystemen auftretenden Variationen der Phasenlängen und die dann entstehende Dämpfung der Kurve (Quastler 1963) erklärt werden. Der hier nahe der Abszisse verlaufende Mittelbereich und die deutliche Abnahme der Fläche unter dem 2. Maximum sprechen jedoch gegen eine stärkere Variabilität der Zellzyklusphasen.

Aus der Verminderung des 2. Gipfels auf eine Reduzierung der Zahl sich teilender Zellen auf ein Drittel zu schließen, ist nicht möglich. Vielmehr ist bei dem vorliegenden Kurvenverlauf zuerst an den Verlust von Markierung bzw. markierten Zellen zu denken (Steel 1972). Technische Fehler bei der Autoradiographie, wie zu kurze Expositionszeit, zelluläre Verdünnung von markiertem 3H -TdR mit unmarkiertem TdR (Post et al. 1967, Post and Hoffman 1965 a), oder Entfernung diploider Zellen aus der sich teilenden Population durch Umwandlung in tetraploide, können die Ursache dafür sein (Post et al. 1963). Auch die bei einer Zellteilung erfol-

gende annähernde Halbierung der Markierung (Oehlert und Buchner 1961, Grisham 1962, Post and Hoffman 1964, Schultze und Maurer 1972) der Tochterzellen kann diesen 2. Gipfel vermindern, weil sich die SKD von Zellen nach der Mitose verringert und eine kritische Grenze unterschreitet, so daß sie als unmarkiert gewertet werden.

Die Vermutung, daß der hier vorliegende 2. Gipfel etwa nur für ein Mitosestadium nachweisbar war (wie bei Post et al. 1965), und so die geringe Höhe und Fläche entsteht, trifft nicht zu. Für alle Teilungsstadien findet sich ein völlig gleichartiges zweites Maximum der FLM-Kurve. Zu denken ist noch an die Möglichkeit, daß hier eine heterogene Population von Zellen mit verschiedenen Subpopulationen unterschiedlicher G_1 -Phasen vorliegt. Dann konnte ein doppelgipfliger 2. Peak entstehen, dessen zweiter Anteil jenseits des Versuchszeitraums von 50 Stunden liegt und nicht mehr sichtbar wird. Dafür gibt es aber bis jetzt an der Leber der Ratte keinen Anhalt.

Die angeführten Möglichkeiten sind aber keinesfalls die Hauptursache für verminderte Höhe und Fläche des 2. Gipfels der vorliegenden FLM-Kurve. Sie erklären sich vor allem aus der Versuchsanordnung und dem Proliferationsverhalten der Leberzellen nach Teilhepatektomie:

Die markierten Mitosenwerte des 2. Gipfels entstanden durch Markierung mit ^3H -TdR zwischen 15 und 30 Stunden nach Operation (siehe Abb. 5). Zu diesem Zeitpunkt hat die DNA-Synthese zwar ein erstes Maximum (Grisham 1960, Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Stöcker 1966, Fabrikant 1967 d, Fabrikant 1968, Fabrikant 1969, Grisham 1969), die DNA-synthetisierenden Zellen liegen aber hauptsächlich im periportalen Bereich. Intermediär und perivenös setzt die DNA-Synthese bei den meisten Zellen erst später ein (Grisham 1962, Eder et al. 1965, Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968, Grisham 1969, Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970). Von den ausgewerteten, in Teilung befindlichen Zellen der FLM-Werte des 2. Gipfels,

müssen die bei Tötung 65 Stunden nach Hepatektomie als markiert erscheinenden Mitosen ihre Markierung durch $^3\text{H-TdR}$ etwa zwischen 15 und 30 Stunden post operationem erhalten haben. Anderenfalls befänden sich diese markierten Zellen beim Tötungszeitpunkt nicht gerade in ihrer 2. Teilung, was sich aus der Zellzyklusdauer als Abstand der beiden FLM-Maxima ersehen läßt. Die dort (bei 65 Std.) im Bereich des 2. FLM-Gipfels als unmarkierte (den Quotienten $\frac{n_M^+}{n_M}$ verkleinernde) Mitosen erscheinenden Zellen konnten aus gleichem Grund zwischen 15 und 30 Std. nach Operation nicht in einer Synthesephase gewesen sein. Sie befanden sich zu dieser Zeit noch in einer längeren G_1 -Phase oder gar in proliferativer Ruhe (G_0) und blieben damit trotz $^3\text{H-TdR}$ -Applikation unmarkiert. Diese Zellen durchlaufen ihre erste postoperative DNA-Synthesephase erst kurz vor Tötung im gleichen Zeitraum wie andere, bereits früher markierte Zellen vom 2. FLM-Gipfel ihre zweite; bei Auszählung (65 Std. post op.) treten sie dann als unmarkierte neben diesen markierten Mitosen auf.

Für Zellen im venösen Bereich des Leberlobulus ergab sich aus Untersuchungen zur Topik des LI eine praesynthetische Phase (G_1) von etwa 40 Stunden Dauer (Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970). Im vorliegenden Versuch ist für die oben besprochenen, unmarkiert bleibenden Mitosen die errechnete G_1 -Phase (65 Std. - ($S + G_2 + M$)) mit etwa 52 Std. erheblich länger. Das heißt, daß bei solchen Zellen der Übertritt von proliferativer Ruhe (G_0) in die eigentliche praesynthetische Phase (G_1) nicht mit Teilhepatektomie erfolgt sein kann; zumindest einige potentiell proliferierende Zellen (G_0 -Zellen) (Lajtha et al. 1962, Quastler 1963) werden erst später in einen Zellzyklusdurchlauf eingeschleust.

Die geringe Höhe und Fläche des 2. FLM-Maximums wird entsprechend nicht durch bevorzugten Verlust markierter Zellen, bzw. Mitosen, sondern durch das Hinzukommen unmarkiert blei-

bender, weil zu Anfang nach Hepatektomie noch nicht in DNA-Synthese befindlicher Zellen verursacht. Die Höhe des 2. Gipfels wird von 2 gegensätzlichen Faktoren entscheidend bestimmt: Von der Zahl der 15 - 30 Stunden post op. bereits DNA-synthetisierenden und sich rasch zwei- oder mehrfach teilenden Hepatocyten, und andererseits von der Zahl der zum gleichen Zeitpunkt noch in G_1 (bzw. G_0) befindlichen Zellen.

Die Zahl der sich nach einer Mitose nicht mehr teilenden Hepatocyten hat auf die FLM-Werte selbst keinen Einfluß und läßt sich damit aus der FLM-Kurve nicht ersehen. Denn das FLM-Verfahren verwendet relative Größen, die von der absoluten Mitosezahl unabhängig sind (Wegener et al. 1964).

7.3. Dauer der Zellzyklusphasen nach Zweidrittel-Hepatektomie

Aus dem Zeitraum zwischen Teilhepatektomie und dem ersten DNA-Synthesemaximum läßt sich die Dauer der praesynthetischen Ruhephase G_1 , oder entsprechend die des gesamten Zellzyklus, kaum sicher abschätzen. (Es ergäben sich etwa 20 - 28 Std. für G_1 , 30 - 36 Std. für C). Eine indirekte Bestimmung von t_C legt das Zeitintervall von 1. und 2. DNA-Synthese Maximum in der Periportalgegend des Leberläppchens zugrunde. Hiermit ergibt sich ein Wert von 30 Std. (Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970). Diese Methode ist aber nur gültig unter der Voraussetzung, daß beide Proliferationswellen von denselben Zellen verursacht werden. Die hier durchgeführte direkte Messung eines t_C von 33 Stunden mit der FLM-Methode bestätigt größenordnungsmäßig die obigen Zeitangaben.

Eine Beschränkung des Zeitvergleichs auf Tiere ähnlichen Alters bzw. Gewichts ist nötig, da die Zellzykluszeit von diesen Faktoren abhängig ist. Beispielsweise nimmt t_C von

13,75 Std. über 21,50 Std. auf 47,50 Std. bei 1 Tag, 3 Tage bzw. 8 Wochen alten, unbehandelten Ratten zu (Post and Hoffman 1964).

Die Verkürzung des Zellzyklus betrifft nach Teilhepatektomie besonders G_1 (Stöcker und Pfeifer 1967, Grisham 1969). So erweist sich die regenerierende Leber mit einem t_{G_1} von 20 Stunden als ein schnell proliferierendes Gewebe, wie Knochenmark (Lord 1964), Darm (Leshner et al. 1961), noch wachsende Organe, etwa Leber (Post et al. 1963, Post and Hoffman 1964, Post and Hoffman 1965 b), oder Tumoren, z.B. Hepatom (Rabes 1969). t_{G_1} kommt dabei schon nahe heran an eine Zeitspanne von 15 Stunden, die vermutlich einen unteren, nicht unterschrittenen Wert für die praeproliferativen Synthesen der Hepatocyten der adulten Ratte darstellt (Rabes und Tuczek 1971). Eine G_1 -Dauer von 4,5 Stunden, wie sie bei einzelnen Zellen seniler Ratten auftritt (Heine und Stöcker 1970), stellt eine Ausnahme dar.

Mit Umschaltung auf den schnellen Proliferationsmodus werden nach Hepatektomie die S-Phase etwa auf die Hälfte, G_2 und M noch deutlich gegenüber der ruhenden Leber verkürzt (Stöcker und Heine 1965 b, Stöcker 1966, Stöcker und Pfeifer 1967). Die hier mit 7,65 Stunden bestimmte, mittlere Dauer der S-Phase, im Gegensatz zu den rund 18 Stunden vor Operation (Stöcker und Heine 1965 b), bestätigt die erfolgte Umschaltung. Der Vergleich mit dem t_S von 8,0 Std. bei jungen (6-8 Wochen, ca. 100 g) (Fabrikant 1967 d, Fabrikant 1968) und t_S von etwa 8,4 bei senilen (2,5 Jahre) (Heine und Stöcker 1970) Tieren zeigt die große Einheitlichkeit der DNA-Synthesedauer bei den verschiedensten Altersstufen mit den bei den einzelnen Zellpopulationen sehr unterschiedlichen Ploidiemustern (Post et al. 1960, Post and Hoffman 1961, Bucher 1967, Grisham 1969). Eine zu folgernde gleiche Dauer der S-Phase für di-tetra- und octoploide Leberzellen wird auch von Heine und Stöcker

(1970) angenommen. Silberkornzählungen bestätigen, daß sich die DNA-Syntheseraten entsprechend wie 1:2:4 verhalten (Heine und Stöcker 1968 b).

Für die Mitose wird an der Leber, wie in vielen schnell proliferierenden Systemen, der 6.-8. Teil der DNA-Synthesephase angenommen (Grisham 1962, Stöcker und Altman 1964, Stöcker et al. 1964, Stöcker und Heine 1965 b). Nach Hepatektomie wird die mittlere Mitosedauer der Hepatocyten bei jungen Tieren beispielsweise mit rund 1 Stunde (Fabrikant 1968), bei senilen mit 1,5 Stunden (Heine und Stöcker 1970) angegeben. Beim noch wachsenden, unbehandelten Organ wird t_M mittel zu 0,3 Std. am 1. Lebenstag und mit 1,7 Std. nach 3 und 8 Wochen bestimmt (Post and Hoffman 1964). Demgegenüber ist $t_{M \max}$ mit 2,18 Stunden in dem hier vorliegenden Ergebnis lang: Es stellt einen Höchstwert dar; mittlere Mitosedauern sind erheblich kürzer (Stöcker und Heine 1965a). Beim Vergleich von Zeiten ist daher in jedem Fall auch das Meßverfahren zu beachten. Am besten lassen sich die Maximalwerte für M, oder auch für $G_2 + M$ vergleichen. Bei t_M mittel werden viele recht unterschiedliche Meßmethoden verwendet.

Die 5,26 Stunden für $(t_{G_2} + t_M)_{\max}$ der hier verwendeten eben ausgewachsenen Tiere bestätigen im Vergleich mit einem Wert von 9 Stunden bei senilen Tieren (Heine und Stöcker 1970) deutlich die altersbedingte Phasenverlangsamung. Dieser Zeitabschnitt des Zellzyklus bleibt damit hier sogar kürzer als bei Leberzellen in vitro mit einem $(t_{G_2} + t_M)_{\max}$ von 8,0 Stunden (Rabes und Jantsch 1971); er kommt schon dem eines (DANA-induzierten) Hepatoms nahe, wo sich dafür etwa 4 Stunden ablesen lassen (Rabes 1969).

Auch Werte von G_2 sind nicht ohne genaue Beachtung der verwendeten Bestimmungsmethoden gegenüberzustellen. Meist sind Minimalwerte bis zum Zeitpunkt des ersten Auftretens von markierten Mitosen angegeben. Auch für G_2 zeigt sich die

deutliche Altersabhängigkeit. Für senile Tiere wird z.B. $t_{G_2 \min}$ mit 2,5 Std. (Heine und Stöcker 1970), bei älteren, ausgewachsenen mit 2,0 Stunden angegeben (Stöcker und Pfeifer 1967). Demgegenüber scheint der eigene, für $t_{G_2 \min}$ abgelesene Wert von etwa 3 Stunden zu lang.

Bestimmt man jedoch versuchsweise aus der FLM-Kurve von Stöcker und Pfeifer (1967) $t_{G_2 \min}$ mit Hilfe des Kurvenanstiegs, wie hier in I.5. geschildert, so ergäbe sich ebenfalls ein t_{G_2} -Wert von rund 3,0 Std. Umgekehrt kommt auch das hier ausgewertete $t_{G_2 \min \text{ abs.}}$ mit 2,5 Std. wieder der gleichartig abgelesenen G_2 -Dauer von Stöcker nah. (Die Zahl von Hepatocyten, deren praemitotische Ruhephase hier wirklich unter dem t_{G_2} -Wert von 3,0 Std. liegt, be-

trägt bei graphischer Bestimmung nicht mehr als höchstens 4,5 %). Zu genauen Zeitvergleichen geeigneter scheint das auf dem Kurvenanstieg basierende Verfahren deswegen, weil dieser G_2 -Wert durch die Lage mehrerer Kurvenpunkte bestimmt wird und so gesicherter ist. Die Zeitmessung zum ersten Auftreten markierter Mitosen ist demgegenüber "störanfälliger"; meist handelt es sich ja bei diesem FLM-Wert um nicht mehr als 2 oder 3 markierte auf hundert Mitosen. Zusätzlich ist es auch nur ein einziger Kurvenpunkt, dessen Zeitabstand zum nächsten oft 1 oder mehrere Stunden beträgt. $G_2 \min$ -Werte sind so nur mit größeren Zeitsprüngen zu bestimmen, was bei Verwendung des Kurvenanstiegs nicht zutrifft.

Aus methodischen Gründen können nicht alle Tiere zur gleichen Stunde getötet und ausgewertet werden. Damit besteht theoretisch die Möglichkeit, daß, ähnlich der circadianen Schwankungen des LI oder MI (Jaffé 1954, Peters 1962 b, Bade and Echave Llanos 1963, Altmann 1966, Günther et al.

1968, Klinge und Mathyl 1969) auch unterschiedliche Phasenzeiten bei den zu verschiedenen Tagesstunden getöteten Tieren zustande kommen könnten. Fehlende tageszeitliche Änderungen der mittleren Silberkornzahl (über verschiedenen Zellarten bei Ratte und Maus) bei vorhandener LI-Schwankung sprechen aber zumindest gegen Schwankungen der S-Phasen-Dauer im Tagesrhythmus (Pilgrim und Maurer 1965, Pilgrim et al. 1965). Für ein anderes Zellsystem, die Hamsterbackentasche, konnte sogar gezeigt werden, daß trotz circadianer Rhythmik des LI, t_S , t_{G_2} und t_M während des ganzen Tages zeitlich konstant bleiben (Izquierdo and Gibbs 1972). Es wechselt dabei nur der Zellfluß in das S-Kompartiment und dadurch die Zahl der in den einzelnen Kompartiments befindlichen Zellen, aus der allein sich die circadianen Markierungsschwankungen erklären.

7.4. Zum Verlauf der FLM-Kurve

Vom Beginn ab fällt die FLM-Kurve eine kurze Strecke mit der Abszisse zusammen, bis die ersten markierten Mitosen auftreten. Der steile und fast zum ersten FLM-Gipfel geradlinig verlaufende Anstieg spricht gegen große individuelle Schwankungen von G_2 (zwischen Minimal- und Maximalwert), wie auch gegen eine sehr lange Mitose-Dauer. Die nicht sehr große Zeitspanne für $(t_{G_2} + t_M)_{\max}$ weist auf nur relativ geringe Variationen von G_2 und M hin (Stöcker und Pfeifer 1967). Dabei zeigt G_2 meist größere Variationen als M (Stöcker und Pfeifer 1967). Konstante Längen der einzelnen Zyklusphasen bei allen Zellen mußten bei der FLM-Kurve einen trapezförmigen, geradlinigen Verlauf ergeben; ansteigender und abfallender Schenkel wären spiegelbildlich (Quastler and Sherman 1959, Wimber 1963). Die vorhandenen Abweichungen vom Idealbild entstehen durch die Variationen

von S, G_2 und M, was aus dem gestreckt S-förmigen ersten Abschnitt des FLM-Maximums (Gerecke 1970), wie auch aus dem abgerundeten, kein längeres Plateau bildenden Gipfel hervorgeht. Der flachere, abfallende Kurvenschenkel beweist, daß auch bei der DNA-Synthesedauer Schwankungen um einen Mittelwert vorhanden sind. Sie sind umso stärker, je flacher der Kurvenabfall erfolgt (Wegener et al. 1964). Das drückt sich auch in der, graphisch bestimmten (Takahashi 1966) Standardabweichung von t_S aus. Ein vollständig symmetrisches Maximum findet man nur bei völlig konstanter S-Phase (Quastler and Sherman 1959, Quastler 1963, Schultze et al. 1972).

Größere Variationen von S, G_2 und M bewirken neben einer flacheren Steigung beider Kurvenschenkel (Lindsay Gibson and Bertalanffy 1972) auch eine erhebliche Verminderung der Höhe der FLM-Gipfel (Quastler and Sherman 1959). Der vorliegende hohe 1. Gipfel ist ein Hinweis, daß die Phasenslängen keine sehr starken Variationen haben und auch für die verschiedenen Tiere weitgehend einheitliche Werte darstellen.

Die häufig bei FLM-Kurven zu beobachtende Dämpfung (Quastler 1963) ist hier nicht sehr deutlich ausgeprägt. Sie kommt zustande, wenn der homogene Block von in S markierten Zellen wegen der Variationen der einzelnen Phasendauern mit zunehmender Zeit nach $^3\text{H-TdR}$ -Injektion immer mehr auseinanderläuft und so den raschen Höhenverlust aufeinanderfolgender FLM-Maxima, die Verbreiterung ihrer Basis bei Flächengleichheit und die Anhebung der Kurve im Bereich zwischen zwei Peaks verursacht. Den stärksten Anteil an dieser Dämpfung hat G_1 als variabelste Phase des Zellzyklus (Post et al. 1963, Pilgrim und Maurer 1965, Prescott 1968). Die Hauptursache der deutlichen Höhenverminderung des 2. Gipfels wurde bereits erklärt (1.7.2.). Seine nicht wesentlich verbreiterte Basis wie der sehr nahe der Abszisse

verlaufende mittlere Bereich der FLM-Kurve bestätigen die nur geringe Dämpfung.

Die wenigen markierten Mitosen im Mittelabschnitt zwischen den Peaks müssen von den übrigen Zellen abweichende Phasenlängen haben. Ihre Markierung könnte jedoch auch erst durch einen Vorgang, wie die vielfach belegte Reutilisation von markierten DNA-Vorläufern (Bryant 1962, Bryant 1963 a, Bryant 1963 b, Fichtelius and Groth 1963, Steel 1963, Steel and Lamerton 1965, Feinendegen et al. 1966, Helpap et al. 1971) oder auch durch Backgroundeffekte entstanden sein. Eine Markierung durch Reutilisation wird mit zunehmender Versuchsdauer zwischen ^3H -TdR-Injektion und Tötung wahrscheinlicher (Helpap et al. 1971, Heininger et al. 1971). Davon könnte auch die Vorwelle vor dem 2. Peak verursacht sein, für die auch noch eine kleine Subpopulation von Zellen mit etwas kürzerer G_1 -Phase als bei den übrigen zu erwägen ist. Für einen solchen bimodalen Verlauf des 2. Gipfels fehlt bisher an der Leber jedoch näherer Anhalt.

Der, im Vergleich zum 1., flachere Anstieg und breitere Gipfel des 2. FLM-Maximums, ist durch die mit längerer Versuchszeit stärker hervortretenden Schwankung der Phasenlängen bedingt. Die eigentlich zu erwartende, wiederum geringere Neigung des abfallenden Schenkels wird wohl deswegen nicht sichtbar, weil sich dort bei ^3H -TdR-Pulsmarkierung, d.h. ab 15 bis ca. 20 Std. nach Hepatektomie, gerade der erste steile Anstieg der DNA-Synthese befindet (Grisham 1960, Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Stöcker 1966, Fabrikant 1967, Rabes 1967, Rabes et al. 1968, Fabrikant 1968, Fabrikant 1969, Tuczek und Rabes 1973). Auf die längeren Versuchszeiten nach ^3H -TdR-Applikation etwa ab 45 Stunden bezogen bedeutet dies, daß die Zahl hier überhaupt kennzeichenbarer, bei Tötung dann markierter Mitosen sehr rasch abnimmt und die Zahl der später unmarkiert bleibenden Mitosen, so kurz nach Hepatektomie in G_0 oder G_1 befindlichen Zellen

bis 50 Stunden noch steigt. Deswegen ist für die Auswertung bei 49 und 50 Std. nach ^3H -TdR nicht mehr mit einer merklichen Zahl markierter Mitosen zu rechnen; der Fluß von Zellen in das S-Kompartiment steigt erst ab etwa 17 - 18 Std. post operationem stärker an (Tuczek und Rabes 1973).

Beim Vergleich zwischen 1. und 2. Gipfel fällt die zunehmende Streuung der Einzelwerte um die Mittellage der FLM-Kurve auf. Ursache sind vor allem die mit der Zeit deutlicher hervortretenden Variationen der Phasenlängen und ihre leichten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren. Die Variationsbreite der Phasenlängen steigt noch mit dem Alter der Tiere (Quastler 1963, Fry et al. 1963) und verändert dann die Gestalt der FLM-Kurve (z.B. flacherer Kurvenanstieg, zunehmender Höhenverlust der Gipfel mit Versuchszeit, etc.).

Bei beiden FLM-Gipfeln verhindern verschiedene Faktoren das Erreichen des Höchstwertes von $\frac{n_M^+}{n_M} = 1$. Mitosen, die

eigentlich ^3H -markiert sind, erscheinen aufgrund zu großer Entfernung von der Schnittfläche (Oberfläche des Schnitts) und der Auswirkung der β -Selbstabsorption (Maurer und Primbsch 1964) als unmarkiert, bzw. die SKZ in der Fotoschicht liegt unter der Markierungsschwelle von 8 SK. Weiter in Betracht zu ziehen sind auch Zellen einer sogenannten " G_2 -Population", die im Bereich der FLM-Maxima als unmarkierte Mitosen erscheinen könnten. Diese erst in der Epidermis der Mäuseohren (Gelfant 1962, Gelfant 1963), dann auch in Nieren und Duodenum (Pederson and Gelfant 1970) nachgewiesenen Zellen werden für unbestimmt lange Zeit in G_2 festgehalten. Sie gehen unter normalen Bedingungen nicht in die Mitose. Erst nach einem Reiz, z.B. Wundsetzung, treten sie ohne neue DNA-Synthesephase in die Teilung ein, auch noch längere Zeit nach dem Reiz. Bei einer Pulsmarkierung mit ^3H -TdR bleiben sie also

unmarkiert, obgleich sie später als Mitosen erscheinen könnten. Ähnliche Auswirkungen treten auf bei Zellen, wie man sie an der normalen Mäuseleber feststellen konnte (Perry and Schwartz 1967), die vor Teilung eine erheblich verlängerte G_2 -Phase langsam durchlaufen. Gegen solche besonderen " G_2 -Zellen" in der Rattenleber sprechen jedoch Dauermarkierungsversuche, wo längere Zeit nach Hepatektomie keine unmarkiert gebliebenen Mitosen mehr gefunden wurden (Stöcker 1966, Stöcker 1968 a, Stöcker 1968 b).

Wie für ein (in vitro untersuchtes) Zellsystem festgestellt werden konnte, zeigen Verteilungskurven für die Dauer von Zellzyklusphasen keinen symmetrischen Verlauf, sondern fallen zu den langen Phasendauern flacher ab (Sisken and Morasca 1965, Sisken 1967); dies gilt für t_C , t_{G_1} und t_{G_2} .

(Für eine aus den eigenen Ergebnissen überschlagsweise von t_{G_2} aufgestellte Verteilungskurve ist dieses Verhalten ebenfalls angedeutet.) Eine Ausnahme macht hier die DNA-Synthesephase; ihre Verteilungskurve scheint symmetrisch und ohne Abflachung nach einer Seite zu sein (Sisken and Morasca 1965).

Bei der Interpretation dieser FLM-Kurven bleibt als ein Hauptproblem immer zu berücksichtigen, daß hier fließende zellkinetische Abläufe an Hand der kurzen Momentaufnahme eines histologischen Schnittes und der daraus erhaltenen graphischen Darstellung abgelesen werden.

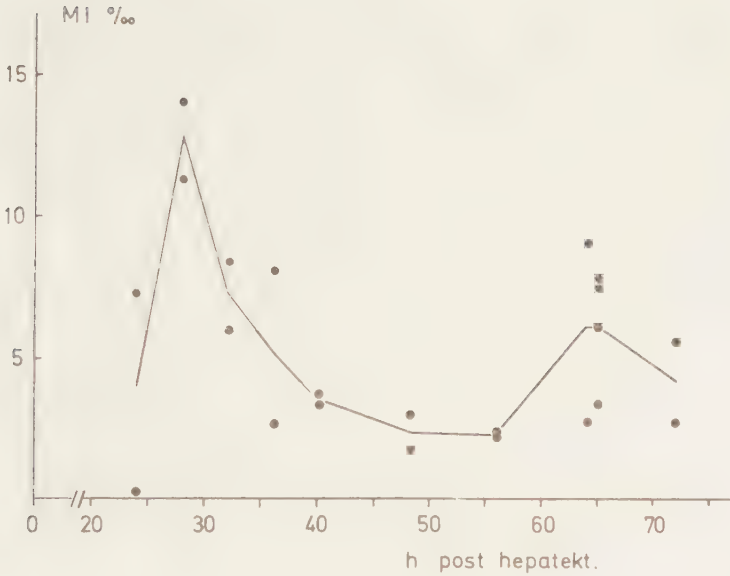


Abb. 1: Mitoseindex der Parenchymzellen in der regenerierenden Leber (Ordinate) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zweidrittel-Hepatektomie (Abszisse). Jeder Punkt stellt den Wert für eine Ratte dar.



Abb. 2: Unterteilung von Leberparenchym zwischen P.S. (Portalfeld) und T.H.V. (terminaler Ast der V.hepatica; sog. "Zentralvene"). Breite des ausgewerteten Streifens 127,8 μm , Länge 383,4 - 511,2 μm . Kennzeichnung der 10 flächengleichen, rechteckigen Unterabschnitte durch die Nummern 1 - 10 (Zone 1 - 10).

Lobuluslänge in
Rasterquadraten

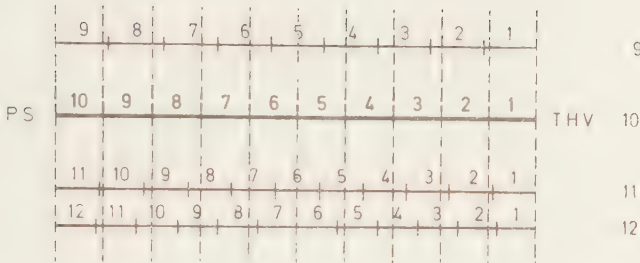


Abb. 3: Schema zum Vergleich und zur gegenseitigen Zuordnung von in Leberlobuli verschiedener Länge lokalisierten Mitosen. (Dazu werden alle 9 - 12 Rasterquadrate zwischen P.S. (Portalfeld) und T.H.V. (terminaler Ast der vena hepatica) zählenden Parenchymstreifen auf einen Standardlobulus von 10 solchen Abschnitten projiziert (siehe auch I. 4.3.). Die beobachteten Mitosen werden wie folgt auf den Standardlobulus bezogen: Die Länge des jeweils untersuchten Lobulus wird in Rasterquadraten (beginnend von T.H.V. bis P.S.) gemessen (Beispiel: 9 Rasterquadrate). Dann wird in dem so unterteilten, auf 3 Rasterquadrate Breite festgelegten Parenchymstreifen die Lokalisation der einzelnen Mitosen durch die Nummer des jeweiligen Lobulusunterabschnitts festgelegt (Beispiel: eine Mitose in der Mitte von Zone 2, eine weitere am Ende von Zone 6). Aus dem obigen Schema wird dann die Lage dieser beobachteten Mitosen im Standardlobulus abgelesen, die man durch senkrechte Projektion vom Ort der Mitose im untersuchten Lobulus auf den Standardlobulus erhält (Beispiel: die eine Mitose kommt in Zone 2, die andere in Zone 7 des Standardlobulus zu liegen).)

radioaktive Versuchszeit in Std.: $3 \frac{1}{2}$

	① 21				② 34				③ 57 3				④ 66				⑤ 70			
	P	M	A	T	P	M	A	T	P	M	A	T	P	M	A	T	P	M	A	T
ohne Mor.	4	9	4	1	1	18	4	5	4	24	13	9	5	30	13	10	3	28	8	16
Körn. 1	1	2				3			1	3	2	1	2	6			1	8	5	1
" 2	1	2				1						1	2	4			1	5	2	1
" 3						2						1	4				1	5		1
" 4						2						1	3				1	5		1
" 5						1						1	2					4		1
" 6						1						1	2					4		1
" 7						1						1	2					4		1
8-15						1						1	1					3		
ab 15												1	2					4		
Mit. ges.	5	11	4	1	1	24	4	5	5	27	15	10	7	36	13	10	4	36	13	17

radioaktive Versuchszeit in Std.: 4

	① 43				② 88				③ 111				④ 90				⑤ 63			
	P	M	A	T	P	M	A	T	P	M	A	T	P	M	A	T	P	M	A	T
ohne Mor.	—	24	9	7	3	45	17	8	1	51	25	7	3	37	17	10	—	16	9	5
Körn. 1	1	1			2	5	1		2	7	1	1	2	5	1	2	2	25	1	—
" 2	1	1			2	1			2	11	3	1	1	13			2	23	3	2
" 3					2	6			2	10	3		1	12			2	20	3	2
" 4					1	6			2	7	3		1	10			2	20	3	1
" 5					1	6			2	7	3		1	8			2	20	3	1
" 6					1	6			2	7	3		1	8			2	20	3	1
" 7					1	6			2	7	2		1	7			2	20	3	1
8-15					1	4			2	3	1		1	4			1	12	2	—
ab 15					2	6			2	6	1		1	7			2	20	3	1
Mit. ges.	2	25	9	7	5	57	18	8	5	69	29	8	5	55	18	12	2	41	13	7

Abb. 4:

Abb. 4: Ausschnitt aus den Ergebnislisten:

(S.34
u.35)

Die Doppelseite zeigt die Ergebnislisten für die Versuchszeitpunkte 3,5 Std. und 4 Std. nach Injektion von ^3H -TdR. (Zu einer Liste gehören jeweils die beiden oberen und beiden unteren Hälften der Seiten zusammen).

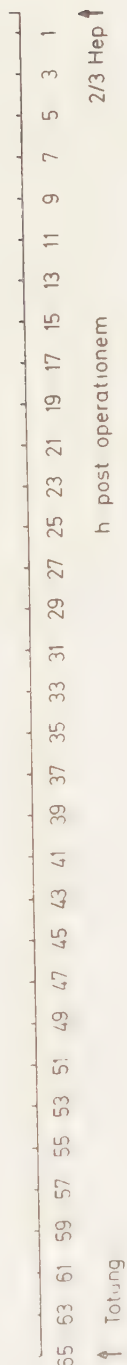
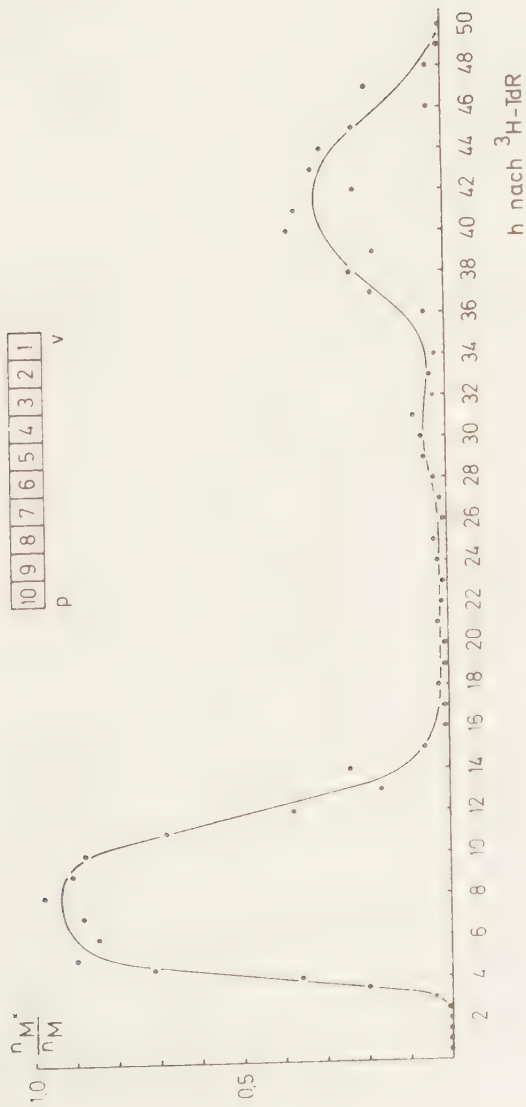
Alle Mitosen sind nach Lokalisation im Lobulus (hier Zonen 1 - 10 angeordnet von links nach rechts und durch Kreis gekennzeichnet), Teilungsstadium (in den Zonen unterteilt in Pro-, Meta-, Ana- und Telophase) und Silberkornzahl (0 - 15 SK, Einteilung am linken Rand der Listen) differenziert (siehe auch I. 4.3.).

(Die obere Ziffer in den Kästchen bedeutet die Anzahl der in dieser Zone mit dieser SKZ festgestellten Mitoseteilphasen, die untere die bei der SKZ dieser Spalte als Markierungsschwelle positiv gewerteten Mitoseteilphasen. Zusätzlich ist über jeder Zonennummer die Zahl der darin gewerteten markierten wie der gesamten Mitosen vermerkt. Für jeden Versuchszeitpunkt ist außerdem die Zahl der insgesamt ausgewerteten Lobuli und Mitosen angegeben).

Abb. 5: Fraktion markierter Mitosen (FLM für das gesamte Leberläppchen (Ordinate) als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von ^3H -TdR (Abszisse) zu verschiedenen Zeiten nach Teilhepatektomie und Tötung aller Tiere 65 Stunden post operationem (untere Skala) (= Summenkurve). Jedem FLM-Kurvenpunkt liegen jeweils zwischen 250 (Mittelabschnitt der Kurve) und 850 (Gipfbereiche der Kurve) ausgewertete Mitosen zugrunde.

Insgesamt sind für alle Kurvenpunkte zusammen ca. 28 500 Mitosen differenziert.

10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
p									
v									



Zellzyklusparameter in Stunden

Versuchsbedingungen

Alter
(+)
(-)

Gewicht Hepatekt. Stamm

t_C

t_{G_1}

t_S

t_{G_2}

t_M

$(t_{G_2} + t_M)_{\max}$

Autor

1 Tag ohne Wistar

nur Prophasen
gewertet

Post
and
Hoff-
man
1964

3 Wo

ohne

Wistar

9,0

9

1,8

1,7

Post
and
Hoffman
1964

5-6
Wo

ohne

Wistar

8,5

9

2,5

1,0

Grisham
1969

8 Wo

ohne

Wistar

28,0

16

1,8

1,7

Post
and
Hoffman
1964

160-
260 g

ohne

Wistar

18,0

2,5

(2)

5,5

(5)

Stöcker
und
Heine
1965 b

6-8
Wo

2/3

Wistar

16,5

5,5

8,0

2,5

(3)

1,0

Grisham
1969

6-8
Wo

2/3

Wistar

8,0

3,0

(9)

1,0

Fabri-
kant
1967 d

110 g

Versuchsbedingungen

Zellzyklusparameter in Stunden

Alter (+) (-)	Gewicht	Hepatekt. Stamm	t_C	t_{G_1}	t_S	t_{G_2}	t_M	$(t_{G_2} + t_M)_{\max}$	Autor
8 Wo 200 g	2/3	Wistar	33	20	7,65	$t_{G_2} \min$ = 3,08 (4)	2,18 (5)	5,26	eigene Ergebnisse
						$t_{G_2} \min \text{ abs.}$ = 2,5 (4)			
328,6 g	2/3	Sprague-Dawley			$t_S \text{ mittel}$	2,0 (2)	3-4 (5)	$t_{G_2} \max$ = 4,5-5	Stöcker und Pfeifer 1970
					7,2	~ 3,0 *	1-1,5 (6)	~ 6,0 *	
2,5 J 400 g	2/3	Sprague-Dawley (für einige Zellen 17,0)			4,5 8,4	2,5 (2)	1,5 (6)	9,0	Heine und Stöcker 1970
3-5 Tg	in vitro	Wistar	20,0	7,0	9,0	~ 2,5 (7)	~ 1,5 (8)	~ 8,0	Rabes und Jantsch 1971
340- 400 g	DANA Hepatom	Sprague-Dawley	14	3,5	6,5	2,5	1,5 (6)	~ 4,0 *	Rabes 1969

- (1): gemessen von Null bis zum 50%-Wert der markierte-Mitosen-Kurve der Prophasen,
- (2): gemessen als $G_2 \text{ min}$ von Null bis zum ersten Auftreten markierter Mitosen,
- (3): gemessen als $G_2 + \text{Prophase}$,
- (4): Auswertung wie in I. 5. angegeben,
- (5): gemessen als M_{max} ,
- (6): gemessen als M_{mittel} ,
- (7): gemessen als $(t_{G_2} + t_M (\text{frühe Prophase}))_{\text{min}}$
- (8): gemessen von später Pro- bis Telophase
- (9): gemessen als $t(G_2 + \frac{M}{2})_{\text{mittel}}$

Tab. 1: Zellzyklusparameter der Rattenleber (in Stunden) bei verschiedenen Versuchs- und Auswertungsbedingungen.

* : Mit dem in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Ableseverfahren (siehe I. 5.) aus der FLM-Kurve des betreffenden Autors bestimmter Zellzyklusparameter.

II. Dauer der Zellzyklusphasen von Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberlobulus zwischen afferentem und efferentem Gefäßpol nach Zweidrittel-Hepatektomie

1. Topik der Leberzellproliferation

An der unbehandelten Leber findet sich bei der ausgewachsenen Ratte nur ein sehr geringer Zellumsatz (Brues and Marble 1957, Jaffé 1954, Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Stöcker et al. 1964, Altmann 1966, Fabrikant 1967 c, Stöcker et al. 1972). Die proliferierenden Zellen sind regellos innerhalb des Leberacinus und gleichartig über alle Lappen des Gesamtorgans verteilt (Schultze und Oehlert 1960, Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Bucher and Swaffield 1964, Edwards and Koch 1964, Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968). Während der Regeneration nach Teilhepatektomie verhalten sich die proliferierenden Hepatocyten nicht mehr gleich, sondern unterschiedlich je nach ihrer Lokalisation im Acinus (Grisham 1962, Fabrikant 1968). Sie sind nun nicht mehr wahllos und gleichmäßig innerhalb eines Läppchens verteilt, zeigen aber in allen Lobuli der Leber gleichartige Anordnung (Grisham 1962, Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968). Dabei beginnt die Proliferation portal und setzt sich mit zunehmender Zeit nach Operation zum venösen Bereich hin fort (Grisham 1960, Grisham 1962, Edwards and Koch 1964, Eder et al. 1965, Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968, Rabes und Brändle 1968, Grisham 1969, Rabes und Tucek 1970, Tucek 1970). Bei Aufteilung der Acini in einen äußeren (= periportal), mittleren und inneren (= perivenösen) Bereich findet man ca. 15 Std. nach Hepatektomie über 80 % der DNA-synthetisierenden Hepatocyten in der äußeren Zone (Grisham 1962, Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968). Die übrigen schon in DNA-Synthese befindlichen Zellen liegen vornehmlich im Mittelbereich, nur sehr wenige in Umgebung der vena hep. (= T.H.V.). Im weiteren Verlauf der Regeneration folgt außen um das P.S. eine Abnahme, in der Mitte und Innen, zur

T.H.V. zu, eine stetige Zunahme der Zahl DNA-synthetisierender Hepatocyten. Nach etwa 42 - 48 Std. sind die zonalen Unterschiede weitgehend aufgehoben, die Proliferation ist jetzt nahezu überall gleich stark. Die Verteilung der Mitoseaktivität innerhalb dieser 3 Zonen zeigt ein zeitlich und räumlich analoges Muster (Fabrikant 1967 c). Auch die RNA-Synthese, unmittelbar vor der DNA-Synthese, läßt wie diese eine charakteristische topische Anordnung mit einem ersten portalen Maximum erkennen (Rabes und Brändle 1968, Tuczek und Rabes 1972).

Bei Unterteilung des Leberläppchens in 9 - 12 wesentlich kleinere Abschnitte erkennt man weitere Besonderheiten in der Topik des Proliferationsablaufs (Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970): Wieder findet man das Maximum der DNA-Synthese zu Beginn portal mit sinkender Intensität sowohl zur v.hep. (T.H.V.) als auch im unmittelbar periportal gelegenen Abschnitt. Auch nach Hepatektomie und Allylformiatintoxikation fällt der LI von einem portalen Maximum zur T.H.V. und zu der dem P.S. benachbarten Zone steil ab (Rabes und Tuczek 1968, Tuczek 1970). Die periportal gelegenen Hepatocyten werden erst später verstärkt in die Proliferation einbezogen (Rabes und Tuczek 1967, Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970), wenn sich die DNA-Synthesewelle schon bis zum venösen Bereich ausgebreitet hat. Nach einer noch zunehmend verstärkten Verlagerung in diese Zone folgt etwa zwischen 48 und 56 Std. post op. von portal her eine kleinere, 2. DNA-Synthesewelle (Rabes 1967, Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968, Rabes und Tuczek 1970). Anschließend nimmt die Proliferationsaktivität in allen Lobulusabschnitten langsam ab.

Wie die erste ist auch die zweite Mitosewelle hauptsächlich durch Zellteilungen im äußeren Drittel des Läppchens bedingt (Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968). Im Ganzen gesehen proliferieren die Hepatocyten aus dem venösen Lobulusbereich erheblich träger, als die in den portalen

Abschnitten (Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Edwards and Koch 1964, Eder et al. 1965, Stöcker 1966, Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968). Das zeigen auch Versuche mit Dauerinfusion oder wiederholten Injektionen von $^3\text{H-TdR}$ nach Hepatektomie, wonach, bei ausgewachsenen Tieren, unmarkierte Zellen fast nur im venösen Bereich zu finden sind (Stöcker 1966, Stöcker 1968 a, Stöcker 1968 b, Fabrikant 1969 b, Rabes et al. 1970, Stöcker und Heine 1971 a, Stöcker et al. 1972).

Im Gegensatz zu diesen zeitlichen Verschiebungen des Proliferationsablaufs liegen über unterschiedliche Zellzyklusparameter einzelner, verschieden lokalisierter Hepatocyten keine quantitativen Daten vor. Die Folgen bestimmter Einflüsse auf den Zellzyklus der Leberzelle sind vor allem im Vergleich von unbehandelter zu teilhepatektomierter Leber (Stöcker und Heine 1965 b, Stöcker 1966), am Beispiel des Organwachstums (Post and Hoffman 1964), bei senilen Tieren (Heine und Stöcker 1970), nach hohen Dosen von $^3\text{H-TdR}$ (Post and Hoffman 1965 a, Post and Hoffman 1967) oder auch bei Bestrahlung (Fabrikant 1967 d, Fabrikant 1969) untersucht worden. Die ermittelten Werte bezogen sich pauschal auf alle Zellen der Leber ohne Berücksichtigung ihrer unterschiedlichen Lage im Acinus. Betrachtungen der Zellzyklusparameter in Abhängigkeit zu bestimmten Strukturen, wie etwa Gefäßen, Oberflächen, Wachstumszonen etc., hat man z.B. an sich teilenden Knochenzellen (Young 1962), transplantierten Mamma-fumoren (der Maus) (Tannock 1968, Tannock 1970) oder Gonocyten der Ratte (Hilscher et al. 1972) durchgeführt.

Im folgenden Versuch soll nun für die Leber die Frage solcher topischer Unterschiede der Zellkinetik untersucht werden. Das Leberläppchen wird dazu, wie unter I. 4.3. beschrieben, in 10 Unterabschnitte geteilt, um für jeden einzelnen dieser kleinen Bereiche gesondert die Zellzyklusparameter bestimmen zu können.

2. Material und Methode

2.1. Versuchsanordnung

Tiermaterial, Operation, Injektion von ^3H -TdR und Tötungszeit, Anfertigung der histologischen Präparate und Auswertung der Autoradiogramme wurden unter I. 4. beschrieben. Zur folgenden Auswertung wurden die schon in Teil I. untersuchten Präparate verwendet.

2.2. Versuchsauswertung

Für jeden einzelnen der 10 Unterabschnitte des sich zwischen P.S. und T.H.V. erstreckenden Leberlobulus wurden jeweils sämtliche in diesem Abschnitt beobachtete Teilungsfiguren, ohne Berücksichtigung des Mitosestadiums, zusammengefaßt. Zellen mit 8 und mehr Silberkörnern über den Chromosomen wurden als markiert gewertet, solche mit weniger oder ohne SK als unmarkiert ($\text{MS} = 8 \text{ SK}$). Für die 10 Unterabschnitte wurden dann (wie in I. 4.4. beschrieben) getrennt die Werte von $\frac{n_M^+}{n_M}$ als Funktion der Zeit nach ^3H -TdR-Injektion angetragen und daraus 10 gesonderte FLM-Kurven konstruiert. Durch deren Auswertung mit dem unter I. 5. angegebenen Verfahren erhielt man von jedem der 10 Unterabschnitte die Zellzyklusparameter.

3. Ergebnisse

3.1. FLM-Kurven der 10 Unterabschnitte des Leberlobulus zwischen P.S. und T.H.V.

In allen 10 Lobulusabschnitten (siehe Abb. 6 und Abb. 7) verlaufen die FLM-Kurven zu Beginn des Versuchszeitraums für kurze Zeit deckungsgleich zur Abszisse. Danach hebt

sich der ansteigende Schenkel des 1. Maximums zuerst in Abschnitt 10 von der Nulllinie ab; nur wenig später folgen nacheinander die Kurven in Abschnitt 9 bis 6. Ab Abschnitt 5 sind die Zeitabstände bis zum Auftreten der ersten markierten Mitosen zunehmend größer; die Kurven verlaufen dabei bis hin zu 1 (= unmittelbar an der T.H.V.) länger auf der Abszisse.

Der Anstieg zum ersten FLM-Gipfel ist in allen 10 Zonen steiler als der Abstieg. Die größte Steigung findet man portal im Abschnitt 8; vom Höchstwert bis ans Portalfeld und in die andere Richtung bis zur Vene nimmt die Steigung schrittweise ab. Dieser Anfangsteil der Kurve geht portal mit stärkerer, perivenös mit schwächerer Krümmung in den 1. FLM-Gipfel über. Ein breites Plateau entsteht nur im Abschnitt 7; weiter zum P.S. zu ist es nicht mehr deutlich ausgeprägt; im venösen Bereich verschwindet es ganz. Etwa 7,5 Stunden nach $^3\text{H-TdR}$ -Applikation ist zuerst bei Zone 8 die Mitte des mit Ausnahme von Zone 1 überall nahezu gleich hohen 1. FLM-Gipfels erreicht; nur Minuten später folgen die beiderseits angrenzenden Abschnitte 9 und 10, bzw. 7 und 6. Zwischen Abschnitt 5 und 1 wird dieser Punkt zunehmend später erreicht.

Der abfallende Kurvenschenkel wird von den portalen zu den venösen Zonen stetig flacher. Bei allen 10 Kurven geht er um 14 bis 18 Std. in den Mittelbereich zwischen 1. und 2. Peak über. Von Abschnitt 4 bis 1 zeigt sich eine zunehmende Streuung der einzelnen FLM-Werte zur Mittellage.

Der Mittelbereich verläuft bei allen FLM-Kurven während 5 bis 10 Std. nahe der Abszisse; im Durchschnitt sind hier nur 1 - 2% Mitosen markiert. In den Lobulusabschnitten 1 und 2 fällt die Kurve im weiteren Verlauf ganz bis auf Null. Mit steigendem Abstand zur $^3\text{H-TdR}$ -Injektion heben sich in den periportalen und intermediären Abschnitten die Kurven wieder von der Abszisse ab.

Zwischen 29 und 32 Std. tritt eine portal deutlichere flache Welle auf, bei der 4 - 10% aller Mitosen markiert sind. Unmittelbar anschließend beginnt (mit Ausnahme der perivenösen Bereiche), der ansteigende Schenkel des 2. FLM-Maximums.

Dieser 2. FLM-Gipfel ist in allen Unterabschnitten wesentlich niedriger als der 1. (vgl. Abb. 8). Den höchsten Wert erreicht er in 8 (mit 0,56 für $\frac{n_M^+}{n_M}$), 9 und 7 liegen nur

wenig niedriger. Unmittelbar periportal ist das Maximum schon bedeutend kleiner, etwa ebenso hoch wie in 6. Von hier bis zur Vene nimmt die Gipfelhöhe rasch weiter ab. Ein 2. FLM-Maximum ist in Abschnitt 3 und 2 nur noch angedeutet und in 1 sind keine markierten Mitosen mehr zu finden. Gleichartig wie die Höhe nimmt auch die Fläche dieses 2. Peaks erheblich ab. Die Basis ist auch bei den höchsten portalen 2. Gipfeln nur wenig breiter als beim 1. Maximum und wird näher zur T.H.V. kleiner.

Der ansteigende Schenkel des 2. FLM-Maximums erfolgt am frühesten (nach 36 Std.) und am steilsten in Abschnitt 9; in den perivenösen Abschnitten läßt er sich zeitlich nicht mehr genau bestimmen. Die Mitte des 2. Gipfels ist in 10 und 9 bei etwa 41 Std. erreicht. Sie verlagert sich bis zum Abschnitt 4 geringfügig auf 43,5 Std. Bis zur T.H.V. bleibt dann die Lage des Gipfelpunkts nahezu unverändert; es vermindert sich nur noch das FLM-Maximum insgesamt.

Der absteigende Schenkel vom 2. FLM-Gipfel ist nur in 8, 9 und 10 flacher als der vorausgehende Anstieg. Intermediär fallen die Kurven zunehmend steiler ab. Perivenös sind beide Schenkel wieder etwa gleich geneigt. Von der 46. bis 49. Std. der Versuchszeit findet man die meisten markierten Mitosen in den Bereichen 7 bis 9; im venösen Bereich verlaufen die Kurven hier schon auf der Abszisse. 50 Std. nach Vorläufer-Injektion fallen in allen 10 Unterabschnitten die FLM-Werte auf Null.

3.2. Zeiten und Veränderungen von G_2 in den 10 Unterabschnitten

Am kürzesten ist $t_{G_2 \text{ min}}$ (Abb. 9) mit 2,8 Std. in Zone 10.

Von hier aus nehmen die Werte sehr gering und gleichmäßig zu bis auf 3,01 Std. in 6. Von 6 nach 5 steigt $t_{G_2 \text{ min}}$ auf 3,22 Std., also um den gleichen Wert wie zwischen den Abschnitten 10 bis 6. Von hier weiter zur T.H.V. zu erhöht sich die Dauer von $t_{G_2 \text{ min}}$ bis zum Höchstwert von 4,53 Std. im Abschnitt 1.

Die Verlängerung von $t_{G_2 \text{ min}}$ beträgt von 10 bis 6 7,5 %; von 6 bis 1 mehr als 50 %.

Die Werte von $t_{G_2 \text{ min abs.}}$ liegen meist etwas niedriger als die von $t_{G_2 \text{ min}}$. Sie zeigen von Zone 10 bis 1 keine gleichmäßige, kontinuierliche Zunahme, sondern stärker schwankende Einzelwerte mit teilweise deutlichen Sprüngen zwischen benachbarten Zonen. Im Ganzen sind die Veränderungen von $t_{G_2 \text{ min abs.}}$ vom P.S. bis zur T.H.V. jedoch gleichartig wie für $t_{G_2 \text{ min}}$.

3.3. Zeiten und Veränderungen von M_{max} in den 10 Unterabschnitten

$t_{M \text{ max}}$ ist mit 1,49 Std. (Abb. 9) im Abschnitt 6 am kürzesten. In 9 und 7 wird es mit 1,66 bzw. 1,64 Std. jeweils geringfügig länger. Nach venos wie auch bis ans P.S. nimmt die maximale Mitosedauer erheblich zu. In Zone 10 ist sie mit 2,25 Std. gleich lang wie etwa in 5 und 4. Bei annähernd gleichmäßiger und rascher Steigung, etwa ab Zone 7 bis zum venösen Bereich, erreichen die Zeiten in 2 und 1 mit 3,18 bzw. 3,17 Std. die höchsten Werte und damit eine Zunahme von 114% gegenüber dem Mindestwert.

3.4. Zeiten und Veränderungen von t_S in den 10 Unterabschnitten

Für t_S (Abb. 9) finden sich, im Gegensatz zu $t_{G_2 \min}$ und $t_{M \max}$, keine signifikanten Veränderungen zwischen den periportal und perivenösen Abschnitten. Zwischen benachbarten Zonen sind nur sehr geringe Unterschiede zu messen. Lediglich venös, in 1, 2, und 3, sind individuelle Schwankungen der Einzelwerte deutlicher. Insgesamt ist die DNA-Synthesezeit in den Abschnitten 1 bis 10 relativ konstant. Das längste t_S , mit 7,84 Std., ergab sich in 6, das kürzeste mit 7,32 Std. in 2. Die Differenz dieser beiden Extremwerte beträgt weniger als 7 %.

Die t_S zugehörigen Standardabweichungen (Abb. 10) sind nicht, wie t_S selbst, in allen 10 Zonen gleich. Den in den Abschnitten 10 bis 4 weitgehend gleichbleibenden Werten um ca. $\pm 1,3$ Std. steht im perivenösen Bereich eine Steigerung bis auf ein Maximum von $\pm 2,8$ Std. in 1 gegenüber. Dabei liegen die Standardabweichungen portal und intermediär etwas unter, venös aber deutlich über dem entsprechenden Wert für die Gesamtleber ohne Berücksichtigung der Topik (siehe I. 6.3.).

3.5. Zeiten und Veränderungen von G_1 und C in den 10 Unterabschnitten (Tab. 2)

Eine ausreichend genaue Bestimmung von t_C , und damit t_{G_1} , ist nur für die periportal und intermediären Abschnitte des Leberlobulus möglich, wobei schon hier die Gültigkeit der Messung durch das rasche Absinken des 2. Gipfels näher zur T.H.V. hin in Frage gestellt ist.

Der Mittelwert für t_C aus allen 3 beschriebenen Bestimmungsmethoden (siehe I. 5.) beträgt in 9 und 10 etwa 32,7 Std. und steigt bis zum Abschnitt 4 auf ungefähr

35,4 Std. Für 3, 2, und 1 läßt sich t_C nicht mehr ermitteln. Beim Vergleich läßt die Berechnung von t_C aus dem Zeitabstand zweier entsprechender Punkte am Beginn der anstiegenden Schenkel von 1. und 2. FLM-Maximum noch am ehesten eine topische Gliederung der erhaltenen Werte erkennen. (vgl. Tab. 2): Für t_C ergeben sich in 10 etwa 32,5 Std., in 9 etwa 31,8 Std., in 8 etwa 32,5 Std., in 7 etwa 32,9 Std., in 6 etwa 32,5 Std., in 5 etwa 33,2 Std. und in 4 etwa 36,6 Std. Daraus erhält man für die Abschnitte 10 bis 4 t_{G_1} -Werte von etwa 20,1 Std., 19,8 Std., 20,5 Std., 20,6 Std., 19,8 Std., 20,1 Std. bzw. 23,2 Std. Für die perivenösen Bereiche 1 bis 3 lassen sich wie für t_C auch für t_{G_1} keine Zeiten angeben.

4. Diskussion

4.1. Vergleich der FLM-Kurven der 10 Lobulus-Unterschnitte

Die FLM-Kurven der 10 kleinen Abschnitte des Leberlobulus zeigen erhebliche zonale Unterschiede. Am auffälligsten sind dabei die Veränderungen des 2. Gipfels zwischen P.S. und T.H.V., solche beim 1. Gipfel und im übrigen FLM-Verlauf treten anfangs weniger deutlich hervor. Wie bereits im Abschnitt I. besprochen, erreicht der 2. Gipfel der FLM-Kurve, bei Zusammenfassung aller Mitosen aus Abschnitt 1 mit 10, bei weitem nicht die Höhe des 1. Sowohl das unterschiedliche Proliferationsverhalten der Hepatocyten nach Teilhepatektomie als auch die besondere Art der Versuchsanordnung könnten die Hauptursachen sein.

Die größten 2. FLM-Maxima (Abb. 8) sind in 7, 8, und 9 fast doppelt so hoch wie das 2. Maximum bei der Gesamtleber (siehe I.). Der 2. Gipfel vermindert sich unmittel-

bar periportal, bis zur Vene zu verschwindet er sogar ganz. Zumindest portal bis intermediär wird dabei auch eine geringe zeitliche Verschiebung sichtbar. Mehrere Erklärungen sind möglich. Es ist naheliegend, als Ursache zonal veränderte Zellzykluszeiten anzunehmen. Ein 2. FLM-Gipfel könnte sich von portal nach venös zunehmend über den Zeitpunkt der letzten $^3\text{H-TdR}$ -Injektion hinaus verlagern und wird dann näher zur T.H.V. nicht mehr nachweisbar. Die nur sehr gering verlagerten 2. Maxima, auch dort, wo sie gut ausgebildet sind, (in 6 - 10), machen aber eine solche starke Zyklusverlängerung als Hauptgrund des Verschwindens der 2. FLM-Erhebung im venösen Bereich wenig wahrscheinlich.

Ein breiteres Verstreichen des 2. Gipfels ließe sich auch durch eine starke, im venösen Bereich höhere Variation von t_C , bzw. von t_{G_1} erklären. Durch die Abflachung des Gipfels

würde sich dabei ein nach venös zunehmender Anteil markierter Mitosen über den Versuchszeitraum hinaus verschieben und ließe den 2. Gipfel dementsprechend kleiner erscheinen. Eine Zunahme der Variationsbreite von Zyklusphasen mit erhöhtem Abstand vom Blutgefäß ist von anderen Zellsystemen bekannt (Tannock 1968). Ein sichtbarer Hinweis für eine solche Erklärung wäre in der verstärkten Abflachung des ansteigenden Schenkels von intermediär zu den venösen Zonen gegeben. Die dann zu erwartende gleichzeitige allmähliche Anhebung des FLM-Mittelabschnitts zwischen Peak 1 und 2, als weiteres Zeichen starker Variationen von t_{G_1} , aber fehlt.

Bei der Bewertung des Fehlens eines 2. Peaks ist zu berücksichtigen, daß der Zeitpunkt 50 Std. nach $^3\text{H-TdR}$ -Injektion identisch ist mit 15 Std. nach Hepatektomie. Erst kurz nach dieser Zeit steigt die DNA-Synthese im portalen Bereich an, und eine zunehmende Zahl von Zellen kann in S markiert werden. Da die DNA-Synthese intermediär und vor allem perivenös aber noch erheblich später zu einem ersten

Höchstwert ansteigt (Grisham 1962, Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968, Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970), ist die Zahl in DNA-Synthese befindlicher, d.h. ^3H -TdR-markierbarer Zellen dort auch erst später erhöht. Das bedeutet, daß mit einer größeren Zahl markierter Mitosen in perivenösen Zonen erst zu einem späteren Zeitpunkt nach Operation, d.h. hier länger vor dem Ende des radioaktiven Versuchszeitraumes zu rechnen ist. Damit können zur Dauer von t_c bzw. t_{G_1} innerhalb der perivenösen Zonen des Acinus auf der Grundlage topischer Verlagerungen der 2. FLM-Maxima keine Aussagen gemacht werden.

Die Höhenunterschiede besonders der portalen und intermediären 2. FLM-Maxima lassen sich dagegen weitgehend aus dem nach Lokalisation im Acinus wechselnden Proliferationsablauf nach Teilhepatektomie erklären. Die höchsten 2. FLM-Gipfel finden sich hier im periportalen Bereich, wo sowohl DNA-Synthese (Grisham 1960, Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Eder et al. 1965, Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968, Rabes und Tuczek 1970) und später auch die Mitoseaktivität (Grisham 1960, Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968) post operativ ein erstes, größtes Maximum haben. Der unmittelbar periportale Zellsaum zeigt durch relativ niedrigere FLM-Maxima auch hier seine Sonderstellung (Abb. 8). Zum perivenösen Bereich werden die 2. Gipfel kleiner und fehlen schließlich ganz.

Weil bei der hier gewählten Versuchsanordnung aus der Höhe des 2. FLM-Maximums auch indirekt die Zahl sich mehrfach teilender Zellen abzulesen ist (siehe I. 7.2.), deutet dies für die portalen Zonen, wo das 2. Proliferationsmaximum am höchsten ist (Fabrikant 1968, Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970), einen hohen Anteil sich nach der ersten posthepatischen Mitose erneut teilender Hepatocyten an; dies wurde u.a. schon von Fabrikant (1967 c, 1968) vermutet. Gleichzeitig bedeutet dies, daß die Zahl der portal kurz nach Hepatektomie, d.h. etwa zwischen 15 und 30 Std.,

an der Proliferation beteiligten Zellen hoch ist. Das bestätigt auch der hohe LI in diesem Zeitraum (Grisham 1962, Eder et al. 1965, Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968, Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970). Die durch die wenigen G_0 -Zellen verursachte Reduzierung des 2. FLM-Gipfels (siehe I. 7.2.) ist dann gering. Dennoch bedeuten die auch periportal nur 50-60% der maximal möglichen Höhe erreichenden 2. FLM-Gipfel, daß dort unmittelbar nach der Hepatektomie **n i c h t g l e i c h z e i t i g** alle Hepatocyten in die DNA-Synthese eintreten.

Aus der Höhenverminderung des 2. Gipfels im intermediären und venösen Lobulusbereich ist auf eine entsprechende Abnahme der Zahl sich mehrfach teilender Zellen und gleichzeitige Zunahme dort kurz nach Hepatektomie noch nicht in den Zellzyklus eingeschleuster G_0 -Zellen zu schließen. Das bestätigt auch der in diesen Zonen noch über längere Zeit post operationem vergleichsweise niedrige LI bzw. MI (Grisham 1962, Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968, Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970). Etliche Hepatocyten im perivenösen Bereich treten sogar über einen größeren Zeitraum nicht aus der G_0 -Phase (Fabrikant 1967 c) heraus. Sie bleiben auch bei Dauermarkierungsversuchen nach Hepatektomie unmarkiert (Stöcker 1966, Stöcker 1968 a, Stöcker 1968 b, Fabrikant 1969b, Rabes et al. 1970, Stöcker und Heine 1971 a, Stöcker et al. 1972) und erklären zu einem Teil, weshalb in den perivenösen Zonen die Zahl markierbarer Zellen und damit auch markierter Mitosen abnimmt.

Neben der Höhenreduzierung beider FLM-Maxima durch technische und methodische Bedingungen (siehe I. 7.2.) könnte noch eine nach Lokalisation (im Acinus) unterschiedliche mittlere SKD über den Mitosen Ursache für die topisch verschieden starke Verminderung sein. Da eine deutliche Abnahme der SKZ markierter Zellen mit Zunahme der Entfernung vom Blutgefäß etwa für Tumoren bekannt und Ursache veränderter FLM-Kurven ist (Tannock 1968, Tannock 1970),

läßt sich hier beim Leberläppchen an ähnliches denken. Gleiche mittlere SKD über Hepatocyten im portalen, intermediären und venösen Bereich (Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968) zeigen aber, daß ^3H -TdR für alle Leberzellen, trotz unterschiedlicher Lokalisation, gleich gut verfügbar ist und storende zonale Differenzen der SKD an der Leber wohl nicht auftreten.

Das erste Maximum der FLM-Kurven verändert seine Form in den einzelnen Unterabschnitten, verglichen mit dem zweiten, nur wenig. Die je nach Zone unterschiedlich steilen ansteigenden Schenkel sind durch entsprechend wechselnde Zeitdauern von G_2 und M und deren verschiedene Variationsbreiten bedingt. Auch die zunehmende Abrundung des FLM-Gipfelplateaus bei gleichzeitiger Höhenminderung bis in den perivenösen Bereich und Abweichungen der einzelnen FLM-Maxima von der symmetrischen Form, entstehen durch verstärkte Schwankungen der Zyklusphasen G_2 , M und S (Quastler and Sherman 1959, Quastler 1963, Wimber 1963, Gerecke 1970), hier vermehrt in Richtung zur Vene (T.H.V.). Die dabei ausgeprägte, sprunghafte Reduzierung der FLM-Gipfelhöhe bei den unmittelbar an der Vene gelegenen Zellen in Zone 1 ist wohl Folge einer besonders raschen Zunahme der Variationen der Phasenlängen von Zone 2 nach 1. Der insgesamt von portal nach venös zunehmend flachere absteigende Kurvenschenkel kennzeichnet zunehmende Schwankungen von t_S um den Mittelwert (Post, Huang and Hoffman 1963, Wegener et al. 1964); das bestätigt auch die besonders venös starke Zunahme der Standardabweichung bis hin zur T.H.V. (siehe Abb. 10).

Wie die Variationsbreiten der Phasenlängen nehmen auch die individuellen Schwankungen der FLM-Werte zwischen den einzelnen Tieren in Richtung zur Vene rasch zu. Wie der niedrige Mittelabschnitt der FLM-Kurven zwischen den beiden Maxima andeutet, treten dort nahezu keine mit zahlreichen

SK markierten Mitosen auf. Einige wenige könnten aufgrund von Abweichungen ihrer Zellzyklusphasen von denen der anderen Zellen (hier besonders G_1), oder durch Reutilisation markierter DNA-Vorläufer entstanden sein. Die mit steigender radioaktiver Versuchszeit zunehmende Markierung durch Reutilisation (Bryant 1962, Bryant 1963, Fichtelius and Groth 1963, Helpap et al. 1971) könnte dann auch die besonders portal als kleine Vorwelle vor dem 2. Gipfel erkennbare erhöhte Zahl markierter Mitosen verursachen. Möglicherweise ist sie auch durch einzelne Zellen mit einem nach Hepatektomie noch langsameren Proliferationsmodus (Stöcker 1966) und entsprechend längerer S-Phase verursacht. Bei deren Markierung zusammen mit Zellen mit schnellem Proliferationsmodus und etwa halbierten S-Phasendauer könnte dann wie hier ein FLM-Maximum mit breiter Basis und starkem Einknick vor dem eigentlichen Hauptgipfel der markierten Mitosen mit kurzer S-Phase zustande kommen. Weitere Ursache dieser Vorwelle könnten auch Hepatocyten mit einer gegenüber den übrigen Zellen kürzeren G_1 -Phase sein.

Vom 1. FLM-Maximum ist die venös stärkere Variation der Zellzyklusphasen bekannt. Die bei diesen Zonen daher zu erwartende größere Zahl markierter Mitosen im Mittelabschnitt des Versuchszeitraumes kommt in den entsprechenden FLM-Kurven jedoch nicht zur Geltung. In den venösen Zonen setzt der allmähliche DNA-Syntheseanstieg post operationem erst relativ spät ein (Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970). Das bedingt eine kurz nach Teilhepatektomie, d.h. hier wegen der besonderen Versuchsanordnung ab der Mitte bis zum Ende des radioaktiven Versuchszeitraums, vom P.S. zur T.H.V. fallende Zahl markierbarer Hepatocyten.

4.2. Zu Veränderungen der Zellzyklusparameter in den Unterabschnitten 1 - 10

Innerhalb der 10 Unterabschnitte des Leberacinus werden $t_{G_2 \min}$ und $t_{M \max}$ insgesamt von portal nach venös deutlich länger, teilweise sogar verdoppelt. Zwischen Abschnitt 10 und der Mitte des Lobulus steigt $t_{G_2 \min}$ nur sehr gering an; dagegen nimmt die Dauer von $t_{G_2 \min}$ dort an bis zur T.H.V. rasch zu. $t_{M \max}$ wird ab Zone 8 nach intermediär und venös schnell und fast gleichmäßig länger. Ein unmittelbar ans Portalfeld angrenzender Saum bleibt mit seinem $t_{M \max}$ hinter diesen kürzesten Zeiten stark zurück. Bei t_S sind dagegen keine nennenswerten topischen Unterschiede erkennbar; lediglich die zugehörigen Standardabweichungen zeigen im venösen Bereich einen Anstieg. Bei t_C bzw. t_{G_1} ist ein bestimmtes zonales Verhalten nur schwer zu erkennen.

Als Ursache je nach der Lage im Acinus wechselnder zellkinetischer Eigenheiten sind Unterschiede in der Umgebung und in den Hepatocyten selbst anzunehmen: Obwohl alle Leberzellen morphologisch als nahezu homogene Population erscheinen (Altmann 1966), zeigen sich mit besonderen Untersuchungsmethoden differente Strukturen in den verschiedenen Zonen des Lobulus. Perivenös findet man bei den adulten Ratten eine große Anzahl von Zellen mit höheren Ploidie-Stufen (bis $8n$ und $16n$), periportal dagegen sind sie hauptsächlich di- und tetraploid (Sulkin 1943, Andrew et al. 1943). Auch die meisten histochemisch nachweisbaren Zellenzyme der Leber zeigen eine topisch inhomogene Verteilung. Das Muster ist von der Gliederung der Strombahn bestimmt (Schuhmacher 1960). Periportal sind enzym-histochemisch in höherer Aktivität nachweisbar u.a. Glucose-6-Phosphatase, ATP-ase, Succinat-Dehydrogenase, Glycerophosphatase und Cytochromoxidasen. Perivenös über-

wiegen Lactat-Hydroxybutyrat- und Glutamatdehydrogenasen, ebenso DPNH und TPNH-Diaphorasen. Die Oxydations- und Glykolyserate sind hier hoch (Wachstein 1959, Novikoff 1959, Novikoff 1961, Wachstein 1963). Ebenso finden sich quantitative Unterschiede der Zellorganellen in Richtung des Blutstromes (Novikoff 1959, Loud 1968). Die Mitochondrien sind portal kürzer und größer, venös dagegen zahlreicher, länglich und kleiner. Ihr Anteil am Zellvolumen nimmt in den Zellagen um die T.H.V. gegenüber dem übrigen Lappchen ab. Dazu sind venös auch Peroxisomen zahlreicher.

Dieser sich topisch ändernde Aufbau der Hepatocyten ist sicher nur zu einem Teil Ursache der nach Lage differenzierenden zellkinetischen Abläufe. Eine äußere, metabolische Heterogenität in der Umgebung der Zellen, bedingt durch unterschiedliche Strömung, Druck, O_2 -Sättigung und Nährstoffkonzentration des Blutes (Rappaport 1963), kommt noch hinzu. In der Leber geraten dabei die dicht um die terminalen afferenten Gefäße liegenden Zellen (Zone I nach dem Konzept von Rappaport et al. 1954, Rappaport 1963) als erste mit arteriell-portalem Blut in Kontakt; die weiter entfernten, näher zur T.H.V. gelegenen Zellen in Zone II-III nach Rappaport sind demgegenüber benachteiligt. O_2 - und Nährstoffgehalt nehmen in Stromrichtung in den Sinusoiden ab.

Die Bedeutung wechselnder Metabolit-Konzentrationen bzw. der O_2 -Versorgung für die Zellproliferation zeigen deutlich Untersuchungen an Tumorzellen (Tannock 1969) oder während der Keimesentwicklung am Einfluß von O_2 auf die DNA-Synthese (Büchner und Hara 1966). Stärkste kompensatorische Regeneration in Bereichen bester Durchblutung bei der Niere (Stöcker 1966, Stöcker 1968 b, Stöcker et al. 1972), Änderung zellkinetischer Parameter in der Magenschleimhaut bei Urämie (Castrup und Lennartz 1972) oder Abnahme der growth-fraction im Mamma-Tumor bei Verminderung des O_2 -Angebots (Tannock 1968) sind weitere Beispiele dafür.

Topische Unterschiede von Mikromilieu und innerem Aufbau der Hepatocyten zwischen P.S. und T.H.V. bewirken aber offensichtlich innerhalb des Lobulus keine gleichartigen Veränderungen aller Zellzyklusparameter. Wird t_{G_2} min portal bis intermediär kaum vom wechselnden inneren und äußeren Milieu im Läppchen beeinflusst, zeigt $t_{M \max}$ im selben Bereich ab Zone 10 bis 8 erst eine deutliche Verkürzung, dann bis zur T.H.V. wieder rasch steigende Phasenlängen. Diese periportale, gegenüber dem niedrigsten Wert erhebliche Verlängerung der maximalen Mitosezeit dürfte sich aus der dortigen schlechteren Blutversorgung erklären. Denn das eigentliche Gefälle des Blutstromes verläuft nicht geradlinig zwischen P.S. und T.H.V., sondern im Winkel dazu, da frisches Blut erst aus den letzten Aufzweigungen der Gefäße außerhalb der Glisson'schen Dreiecke entspringt. Die direkt am P.S. gelegenen Zellen scheinen zwar dem afferenten Gefäßpol am nächsten zu liegen, dennoch ist die Blutversorgung dort nicht optimal. Zellen, die ein Stück vom Portalfeld entfernt lokalisiert sind, liegen dagegen im Bereich "bester" Blutversorgung (Rappaport 1963), entsprechend der Zone I. Offenbar bestimmen diese besonderen Verhältnisse die minimale Dauer von $t_{M \max}$ in diesem Bereich. Dagegen sind andere Zellen, obgleich unmittelbar periportal gelegen, weiter von den Endaufzweigungen der afferenten Gefäße entfernt und in Bezug auf O_2 - und Nährstoffversorgung benachteiligt. Sie fallen damit in Zone III (nach Rappaport), wie auch ein Teil der intermediären und die venösen Bereiche des Acinus. $t_{M \max}$ ist in dieser Zone gegenüber dem angrenzenden Parenchym sehr stark verlängert und etwa gleich lang wie bei Hepatocyten aus Abschnitt 4 und 5. Dies ist ein indirekter Hinweis dafür, daß diese weit auseinander liegenden Zonen 10 und 4 bzw. 5 zirkulatorisch gleichgestellt sind. Die Sonderstellung unmittelbar periportalener Zellen ist schon von Untersuchungen zur DNA-

Synthese nach Teilhepatektomie bekannt (Rabes und Tuczek 1967, Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970). Das DNA-Synthesemaximum wird verspätet gegenüber benachbarten Zellen, etwa zur gleichen Zeit wie bei Zellen am Übergang vom intermediären zum venösen Bereich erreicht.

Im Gegensatz zu $t_{M \max}$ verändert sich $t_{G_2 \min}$ von portal bis in intermediäre Zonen nur geringfügig. Die im venösen Bereich rasch zunehmende Phasenverlängerung von G_2 läuft parallel zu Veränderungen im Aufbau der Zellen. Während intermediäre und periportale Zellen sich in den Zellorganellen wie Mitochondrien, endoplasmatischem Reticulum, Lysosomen und Peroxysomen sehr stark ähneln, treten deutliche Differenzen erst in den venösen Abschnitten auf (Loud 1968). Das läßt vermuten, daß die Dauer der praemitotischen Ruhephase weniger als die Mitose selbst vom zirkulatorisch bedingten Mikromilieu, sondern mehr von endogenen, zellulären Strukturen abhängt.

Aus den einzelnen FLM-Kurven ergibt sich, daß die mittlere Dauer der DNA-Synthesephase für alle Unterabschnitte des Leberlobulus ein offensichtlich konstanter Wert ist. Zwar laufen praeparative Schritte wie die RNA- und Proteinsynthese in portalen Bereichen schneller ab (Rabes und Brändle 1968), wenn jedoch die Reduplikation der DNA der Hepatocyten einmal eingesetzt hat, folgt trotz unterschiedlicher Blutzusammensetzung (O_2 , Metabolite, Nährstoffe) und wechselnder innerer Zellausstattung die Synthesephase von überall gleicher Dauer. Zwischen den, vor allem periovenösen, höherploidern Kernklassen (8 n, 16 n) (Sulkin 1943, Andrew et al. 1943) und den portal hauptsächlich di- und tetraploidern Hepatocyten bestehen bei der DNA-Synthesezeit keine Unterschiede. Diese relative Unabhängigkeit der S-Phase von innerem und äußerem Zellmilieu bestätigen auch Vergleiche der Zellzyklusparameter in verschiedenen Versorgungszonen bei Tumorsträngen (Tannock 1968): Trotz bedeutend schlechterer O_2 - und Nährstoffversorgung ist

dort t_S auch in der am weitesten vom Blutgefäß entfernten Zone nicht verlängert, wogegen sich LI, growth-fraction und die übrigen Zellzyklusparameter mehr oder weniger deutlich ändern. Ähnlich variieren t_{G_2} und t_M in Metaphyse, Endost und Periost an der Tibia der Ratte, t_S jedoch bleibt überall konstant (Young 1962).

Die einzige hier erfaßbare topische Veränderung bei der DNA-Synthesephase zwischen den Abschnitten 10 und 1 des Leberlobulus betrifft die Standardabweichung von t_S . Von Zone 10 bis 5 besteht keine nennenswerte Zunahme der Variabilität. Ab Zone 4 steigt die Standardabweichung im venösen Bereich rasch an und hat in 1 fast den dreifachen Wert von 10 erreicht. Möglicherweise stehen diese Unterschiede der Variationen von t_S mit der Änderung der Zellstruktur in Zusammenhang, die venös zunehmend deutlicher wird (Loud 1968). Daneben sind auch größere individuelle Schwankungen von t_S bei den im venösen Bereich zahlreicheren höherploidern Kernklassen als bei den übrigen Hepatocyten als Ursache denkbar. Vielleicht macht sich aber auch hier bemerkbar, daß sämtliche Leberlobuli der Längen von 9-12 Einheiten auf eine Ideallobuluslänge von 10 Zonen projiziert wurden. Während trotz verschieden langem Bälkchen die Versorgung mit O_2 und Nährstoffen in je zwei einander entsprechenden portalen bis intermediären Unterabschnitten gleich sein könnte, muß sie sich auch zwischen zwei gleichen Zonen in der Umgebung der Vene deutlicher ändern, je nachdem ob die Entfernung P.S. bis T.H.V., und damit die Blutstrombahn, nun 383 μm oder bis zu 511 μm lang ist.

Besondere topische Veränderungen von t_C , und damit t_{G_1} , zwischen P.S. und T.H.V. bleiben, wie schon die FLM- $_1$ Kurven zeigen, trotz gewisser Verlagerungen der 2. FLM-Maxima weitgehend unklar. Der Wechsel der inneren Struktur und des äußeren Zellmilieus der Hepatocyten führen zwar bei t_{G_2} und t_M von portal nach venös zu einer deutlichen

Zunahme; bei G_1 dagegen, die die variabelste Phase des Zellzyklus darstellt (Sisken and Morasca 1965, Altmann 1966, Sisken 1968) und auf der vor allem Unterschiede bei den Generationszeiten beruhen (Young 1962, Post et al. 1963, Wegener et al. 1964, Pilgrim und Maurer 1965, Schultze 1968, Prescott 1968, Grisham 1969), bleiben die erwarteten stärkeren Phasenveränderungen aus. Möglicherweise sind aber t_{G_1} - bzw. t_C -Unterschiede nur deswegen kaum festzustellen¹, weil die 2. FLM-Gipfel intermediär und perivenös zu rasch an Fläche und Höhe verlieren (vgl. II. 4.1.). Es ist auch nicht auszuschließen, besonders beim Vergleich der portalen 2. FLM-Gipfel, daß wirklich nur geringe topische Zeitveränderungen von G_1 vorliegen. Einige Tatsachen könnten dies bestätigen: Sisken und Morasca (1965) und Sisken (1968) fanden (an Zellkulturen), daß die Gesamtvariabilität der Zellzykluszeit t_C geringer ist als die Summe der Variabilitäten der Einzelphasen, d.h. es besteht eine nicht nur zufällige Beziehung der Dauer der einzelnen Zyklusphasen zueinander. Es darf nicht angenommen werden, daß die einzelnen Phasen des Zellzyklus völlig unabhängig voneinander in ihrer Länge variieren können. Die deutliche Zunahme von t_{G_2} und t_M in den einzelnen Zonen muß nicht von einer G_2 vergleichbaren Änderung von t_{G_1} begleitet sein. Die stärkere Verlängerung einer G_1 Phase kann jeweils die Variationsmöglichkeiten einer anderen vermindern. McDonald (1962) stellte bei Tetrahymena fest, daß eine entgegengesetzte Beziehung zwischen der Länge von G_1 und der Länge von G_2 + Prophase in einer Zelle bestehen kann, daß also die Verkürzung der einen die Verlängerung einer anderen Phase bewirkt, vorausgesetzt, daß wie bei der regenerierenden Leber, die S-Phase konstant ist.

Für die nur geringen topischen Änderungen von t_{G_1} lassen sich noch weitere Ursachen denken. So liegt bei G_1 der Regeneration nach Teilhepatektomie das Proliferations-

maximum zu Beginn im portalen Bereich (Grisham 1962, Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968). Durch die große Zahl der in diesem Bereich neu entstehenden Zellen entsteht ein zentrifugaler Wachstumsdruck von portal her. Anfangs periportal markierte Tochterzellen werden durch passive Verdrängung in ihrer Lokalisation verändert (Grisham 1962, Fabrikant 1967 c) und näher zur T.H.V. verlagert. Damit könnten FLM-Kurven durch Zellmigration (Tannock 1968) oder auch durch Zellverdrängung erheblich beeinträchtigt werden, da eine mitotische Zelle, die in einer bestimmten Zone beobachtet wird, zum Zeitpunkt der ^3H -TdR-Applikation noch in einer anderen gewesen sein kann. Möglicherweise erfolgt in den einzelnen Zonen eine Vermischung von ortsständigen und sekundär dorthin verdrängten Zellen, so daß vorher bestehende topische Unterschiede der Zellzyklusparameter zum Teil verwischt werden. Für S, G_2 und M wären diese Störungen sicher geringer, da das betrachtete Intervall von Injektion bis zur Tötung wohl zu kurz ist. Bei G_1 , gemessen aus dem Abstand der zwei FLM-Gipfel, könnten diese Zellverschiebungen jedoch von erheblicher Bedeutung sein.

Für die Leber ist eine insgesamt deutliche Zunahme der praesynthetischen Ruhephase G_1 von portalem zu venösem Bereich aus dem sich ändernden Zeitintervall zwischen Teilhepatektomie und DNA-Synthese-Maximum in den verschiedenen Zonen des Acinus abzuleiten (Rabes und Tuczek 1970); etwa 20 Std. portal sind der geringste, etwa 40 Std. perivenös der höchste mit dieser indirekten Methode ermittelte Wert. Aus den hier vorliegenden FLM-Kurven ist bei t_{G_1} keine vergleichbare Verlängerung zu sehen. Neben den oben bereits erwähnten, möglichen Ursachen für diese nur geringen topischen Unterschiede von t_{G_1} muß daran gedacht werden, daß in der Leber nach Teilhepatektomie zwei verschiedenartige G_1 -Phasen zu unterscheiden sind. Bei dem Zeitabschnitt von Hepatektomie bis zum Beginn der DNA-

Synthese in einer bestimmten Zone handelt es sich nicht um eine beliebige praesynthetische Phase (G_1) vor einer Mitose, sondern hier erfolgte *e r s t m a l i g* bei ruhenden Zellen die Reaktion auf den Proliferationsreiz, die Umschaltung von G_0 nach G_1 ; d.h. der Eintritt in den Zellzyklus aus der Ruhephase und weiterhin die Umschaltung vom langsamen auf den schnellen Proliferationsmodus. Es ist wahrscheinlich, daß diese Vorgänge nach Durchlaufen der ersten Mitose vor dem folgenden Zellzyklus nicht mehr in gleicher Art ablaufen. Beispielsweise zeigt die Thymidinkinase keinen Abfall mehr nach dem ersten Zyklusdurchlauf (Bollum and Potter 1959). Zwischen zwei aufeinanderfolgenden FLM-Gipfeln aber wurde hier t_{G_1} bestimmt. Deswegen sind beide oben verglichene G_1 -Phasen also nicht als identisch anzusehen.

Wie in I. 7. erwähnt, sind kurz nach Hepatektomie zumindest einige Zellen, besonders aus dem venösen Bereich, noch nicht in den Zellzyklus eingetreten. Sie befinden sich noch in der G_0 -Phase und gelangen erst später nach wechselnden Zeitintervallen in G_1 bzw. S. Der wesentlich längere Zeitraum zwischen Hepatektomie und der 1. Zellteilung, im Vergleich zum Zeitintervall bis zur 2. Teilung, könnte nun aus einer nach Lage der Zelle im Acinus unterschiedlich langen Phase proliferativer Ruhe (G_0) (Lajtha et al. 1962, Quastler 1963) und der sich anschließenden, nach Lokalisation ebenfalls etwas veränderbaren, eigentlichen G_1 -Phase bestehen, in die die Zelle aus G_0 erst eintritt.

Eine Entscheidung, welche der hier dargelegten Möglichkeiten die nur geringen Änderungen von t_{G_1} , und damit t_C , bewirkt, oder ob mehrere gleichzeitig t_{G_1} zutreffen, ist aus den vorliegenden Ergebnissen nicht sicher zu treffen.

Abb. 6: Fraktion markierter Mitosen (Ordinate) als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von ^3H -TdR zu verschiedenen Zeitpunkten nach Teilhepatektomie (Abszisse) jeweils für einen der 10 Unterabschnitte des Leberlobulus (Topik).
Die rechteckige Umrandung der Nummer der ausgewerteten Zone auf der Strecke P.S. - T.H.V. kennzeichnet die Lokalisation der zugehörigen FLM-Kurve (portale Zonen in der Darstellung links oben, venöse rechts unten) (Topik). Jedem FLM-Kurvenpunkt in jeder der 10 Einzelkurven liegen durchschnittlich knapp 60 Mitosen zugrunde. Dabei sind in portalen Zonen und in den FLM-Gipfelbereichen meist mehr, in venösen Zonen und den Mittelbereichen der Kurven weniger Mitosen ausgewertet.

Abb. 7: Fraktion markierter Mitosen (Ordinate) als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von ^3H -TdR zu verschiedenen Zeitpunkten nach Teilhepatektomie (Abszisse) und als Funktion der Lage der Mitosefiguren in den 10 Unterabschnitten des Lobulus zwischen Portalfeld (P.S.) im Vordergrund und terminalem Ast der vena hepatica (T.H.V.) im Hintergrund der Graphik. Im Gegensatz zu den FLM-Kurven von Abb. 6 ist hier nur jeweils das erste FLM-Maximum, bzw. der Versuchszeitraum bis zu 18 Std. nach ^3H -TdR-Applikation dargestellt.



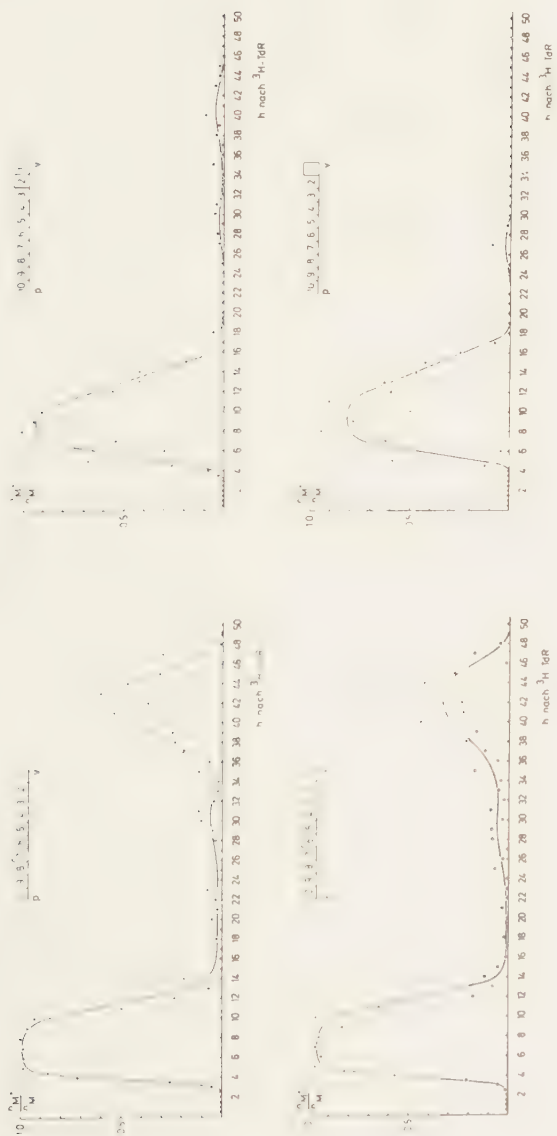
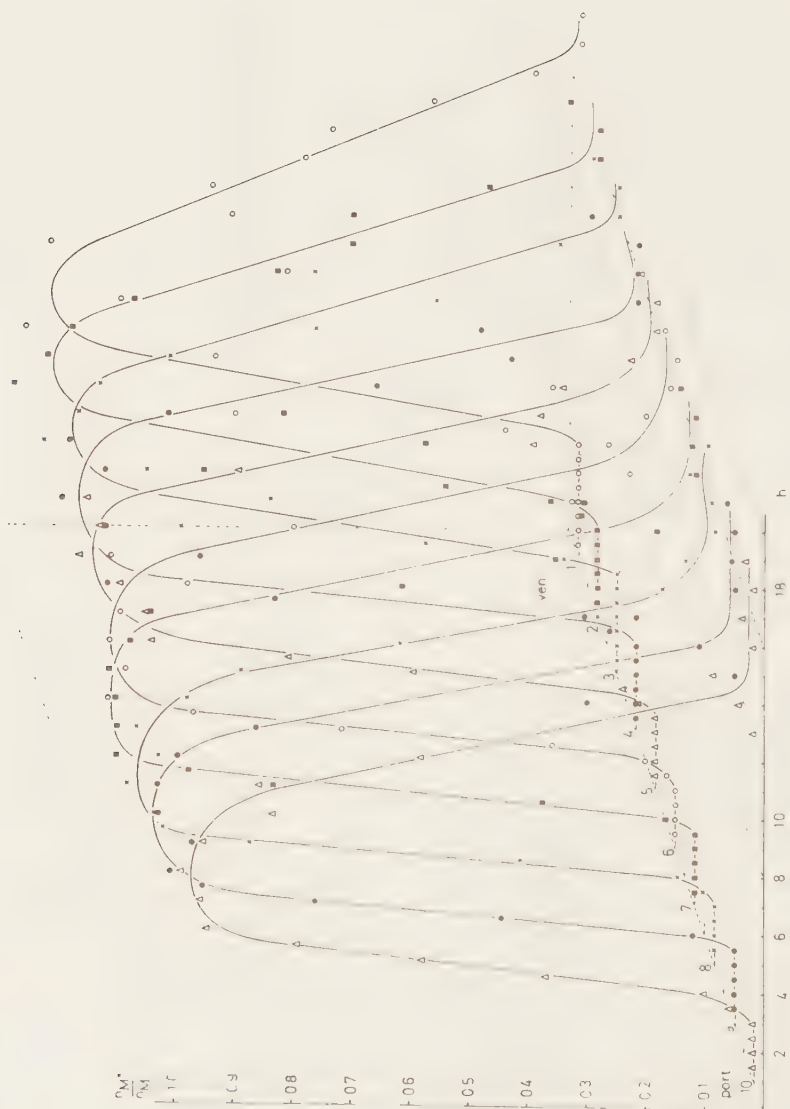


Abb. 6



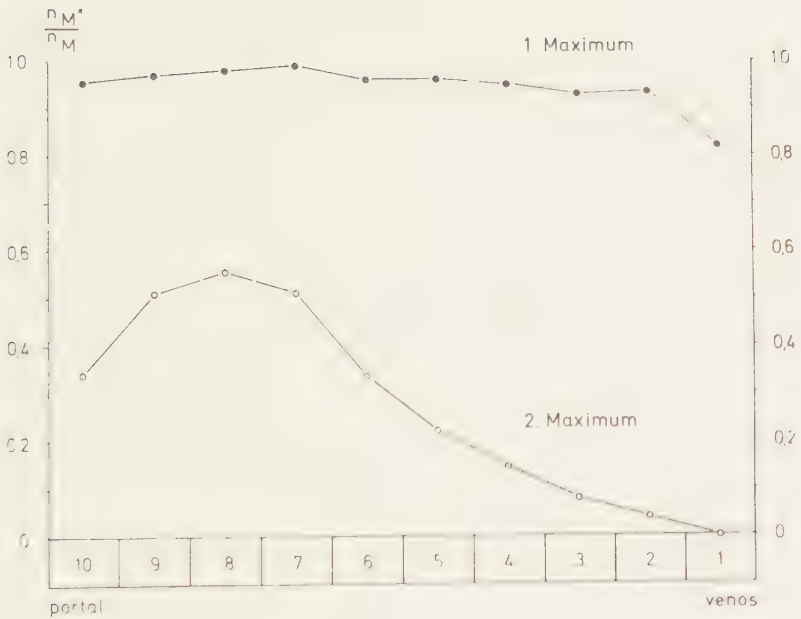


Abb. 8: Jeweils höchster Wert von $\frac{n_M^+}{n_M}$ beim ersten FLM-Maximum (●—●) bzw. zweiten FLM-Maximum (○—○) in den FLM-Kurven der 10 Unterabschnitte des Leberlobulus (Näheres siehe II. 3.1.)

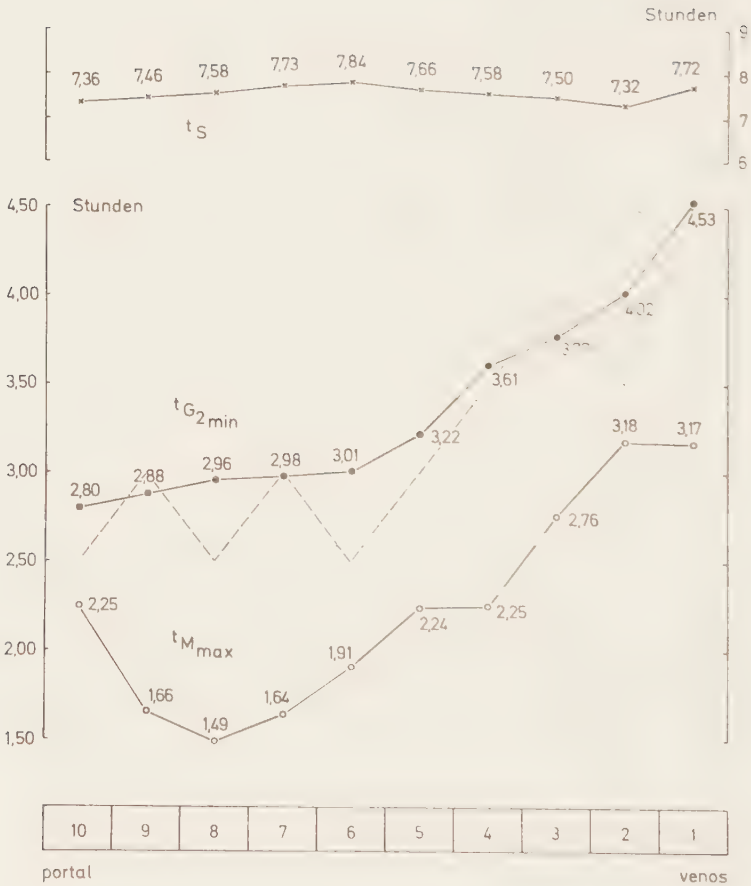


Abb. 9: Zellzyklusparameter der proliferierenden Hepatocyten in den 10 Unterabschnitten des Leberlobulus (Zeitangaben jeweils in Stunden).

t_S : x—x; $t_{G_2 \min}$: ●—●;

$t_{G_2 \min \text{ abs.}}$: — — —; $t_{M \max}$: ○—○;

(Näheres zur Bestimmung siehe I. 5.)

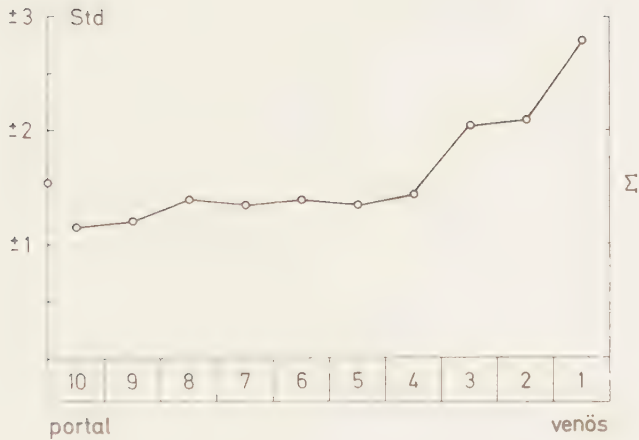


Abb. 10: Standardabweichungen von t_S (Takahashi 1966)
in den 10 Unterabschnitten des Leberlobulus
(jeweils bestimmt aus dem ersten Maximum
der FLM-Kurve), (Topik): $\circ$ — $\circ$;
zum Vergleich: Standardabweichung von t_S für
den gesamten Leberlobulus ohne
Berücksichtigung der Lokalisation der
einzelnen Mitosen ("Summenkurve"): Σ

ZONE	t_C	t_{G_1}
10	32,5	20,1
9	31,8	19,8
8	32,5	20,5
7	32,9	20,6
6	32,5	19,8
5	33,2	20,1
4	36,6	23,2
3	-	-
2	-	-
1	-	-

Tab. 2: t_{G_1} und t_C (in Stunden) in den 10 Unterabschnitten des Leberlobulus zwischen P.S. und T.H.V. t_C bestimmt aus der Entfernung zweier korrespondierender Punkte an den ansteigenden Schenkeln des 1. und 2. FLM-Maximums. (- = kein t_C mehr bestimmbar).

III. DAUER DER MITOSE UND IHRER STADIEN IM GESAMTPARENCHYM DER LEBER UND IN UNTERABSCHNITTEN DES LEBERLOBULUS

1. Mitose, Mitosestadien und deren zeitliche Bestimmung

Nach der Reduplikation der DNA folgt in der regenerierenden Leber der Ratte bei der überwiegenden Zahl von Zellen eine Mitose (Stöcker et al. 1964). Eine endomitotische Polyploidisierung spielt nur eine untergeordnete Rolle (Stöcker und Altmann 1964; Stöcker et al. 1964, Stöcker und Heine 1965 b). Die Teilung ist in ihrer Zeitdauer im Verhältnis zur intermitotischen Phase kurz (Grundmann 1971). Für die meisten Zellarten (Pflanzen und Tiere) beträgt die Mitose selbst zwischen 30 Minuten und 3 Stunden; bei nur wenigen Zellen liegt sie außerhalb dieses Bereichs (Mazia 1961). Durch Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase ist die Mitose in Unterabschnitte gegliedert. Ihr Beginn mit der Prophase ist zeitlich nur schlecht definiert (Mazia 1961). Die Prophase erreicht ihr Vollbild, wenn die Chromosomen nach stetig zunehmender Kondensation als deutlich erkennbares Knäuel innerhalb der noch intakten Kernmembran liegen. Nach Auflösung der Kernmembran und Verschwinden des Nucleolus setzt mit der Metakinese (bzw. Prometaphase) die Umordnung der Chromosomen ein. Mit der Verlagerung in ihre Metaphase-Positionen ist die Prophase beendet. Damit zeigt sich nun das auffälligste Bild der Mitose, die Metaphase, mit Anordnung der Chromosomen und ihren Kinetochoren in der Äquatorialplatte. Sie erscheint optisch als eine Phase der Ruhe zwischen Phasen der Bewegung in der Zelle. Die folgende verstärkte Aufspaltung der Chromosomen-Längshälften (Chromatiden) kennzeichnet den Übergang in die Anaphase, beide Chromatiden bewegen sich dann zu den Spindelpolen. Nach Erreichen der Pole lagern sich die Chromosomen in der Telophase zuerst dichter zusammen und verlieren dabei ihre optische Individualität. Mit der allmählichen Wiederauflockerung der Chromosomen

folgt die Rekonstruktion zum Interphasekern. Auch der Abschluß der Mitose erfolgt mehr oder weniger fließend (Mazia 1961, Grundmann 1971).

Von den einzelnen Teilstadien dauert durchschnittlich die Metaphase etwa halb so lang wie die Prometaphase; die Anaphase ist kürzestes Mitosestadium. Die Zeitanteile an der gesamten Teilungsdauer sind aber, je nach Zellart, unterschiedlich (Mazia 1961, Grundmann 1971).

Die mittlere Dauer der Mitose in der Leber erhält man üblicherweise für das unbehandelte Organ (im steady state) aus Mitoseindex (MI) und bekannter Generationszeit (Schultze et al. 1972), oder aus der Dauer der S-Phase zusammen mit Markierungs- und Mitoseindex (Wegener et al. 1964, Schultze et al. 1972, Schultze and Maurer 1972). Da eine Teilhepatektomie aber zu einer partiellen Synchronisation der verbleibenden Zellpopulation führt (Altmann 1966, Bucher 1967, Fabrikant 1968, Klinge und Mathyl 1969, Fabrikant 1969), sind solche Bestimmungsmethoden post operationem nicht mehr anwendbar. Weil das FLM-Verfahren durch Teilsynchronisation insgesamt nur wenig behindert wird (Wimber 1963), ist es dagegen auch für Mitosebestimmung an der regenerierenden Leber noch geeignet.

Die mit den markierten Mitosen wohl am leichtesten zu bestimmenden maximalen Mitosedauern werden mit ca. 2-5 Stunden angegeben (Stöcker 1966, Stöcker und Pfeifer 1967, Rabes et al. 1972). Die mittlere Teilungszeit ist aber wesentlich kürzer als $t_{M \max}$ (Stöcker und Heine 1965 a); Angaben dazu liegen bei etwa 1-1,5 Stunden (Stöcker und Pfeifer 1967, Fabrikant 1968). Aus einer einzigen FLM-Kurve kann man sie nur ungenau bestimmen, z.B. durch Subtraktion von t_{G_2} von der Zeit, ab der 50% aller Mitosen markiert sind t_{G_2} (Quastler and Sherman 1959; Post and Hoffman 1964). Wohl deswegen wird $t_{M \text{ mittel}}$ oft nur zusammen mit t_{G_2} als $t_{(G_2 + \frac{1}{2} M)}$ angegeben (Wegener 1964, Fabrikant

1967 d, Fabrikant 1968, Lindsay-Gibson and Bertalanffy 1972). Der Zeitabstand zweier gesonderter FLM-Kurven für Prophasen und Telophasen gestattet dagegen auch allein die durchschnittliche Mitosedauer zu ermitteln (Stöcker und Pfeifer 1967).

Zur Zeitdauer von Pro-, Meta-, Ana- und Telophase sind schon an Hand des prozentualen Anteils der einzelnen Mitosestadien an der Gesamt-Mitosezahl Rückschlüsse möglich (Post and Hoffman 1964). Mit den Zeitabständen gesonderter FLM-Kurven für Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen läßt sich die Dauer von Unterabschnitten der Mitose unmittelbar messen (Post et al. 1963).

Im folgenden Abschnitt soll nun an den Parenchymzellen der regenerierenden Leber die mittlere Zeitdauer der Mitose und von bestimmten Teilphasen untersucht werden: Zunächst vom gesamten Leberlobulus zwischen P.S. und T.H.V. (= Summenkurve), und dann, entsprechend Absatz II., in kleineren Untereinheiten davon (= Topik).

2. Material und Methode

2.1. Versuchsanordnung

Tiermaterial, Operation, Injektion von ^3H -TdR, Tötung, Anfertigung von histologischen Präparaten und Auswertung der Autoradiogramme sind hier und in Absatz I. identisch und unter I. 4. näher beschrieben. Für diese Untersuchung wurden die schon in I. nach Mitosestadium (Pro-, Meta-, Ana- oder Telophase), Silberkornzahl und Lokalisation im Acinus differenzierten Hepatocyten herangezogen.

2.2. Versuchsauswertung

2.2.1. Auswertung im gesamten Leberlobulus ohne Berücksichtigung der Lage der Mitosen im Läppchen ("Summenkurve")

Alle Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen in den Zonen 1 mit 10 des Leberlobulus wurden, ohne Berücksichtigung ihrer Lokalisation, je nach Teilstadium zu einer Gruppe zusammengefaßt. Mitosen mit 8 und mehr Silberkörnern über den Chromosomen zählten als markiert, solche mit weniger oder ohne SK als unmarkiert ($MS = 8 SK$). Von jedem einzelnen Mitosestadium wurde die Fraktion markierter Mitosen als Funktion der Zeit nach 3H -TdR-Injektion angetragen und damit, wie in I. 4. beschrieben, FLM-Kurven erstellt.

Die ersten Maxima der FLM-Kurven für Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen wurden anschließend in einer gemeinsamen Graphik zusammengefaßt (Abb. 11). Dann folgte, jeweils bei $\frac{n_M^+}{n_M} = 0,5$, die Messung der Zeitabstände zwischen den Kurven von Pro- und Metaphasen, Meta- und Anaphasen, Ana- und Telophasen und auch des Intervalls von Pro- bis Telophasenkurve.

Durch geradlinige Verlängerung des ansteigenden Schenkels eines FLM-Maximums nach unten bis zum Schnitt mit der Abszisse und nach oben bis zu $\frac{n_M^+}{n_M} = 1,0$ ergaben sich für jedes Teilstadium je zwei zusätzliche Meßpunkte. Bei den Hilfspunkten für $\frac{n_M^+}{n_M} = 0$ bzw. $1,0$ wurden dann die Zeitabstände zwischen den einzelnen Mitosestadien bestimmt.

2.2.2. Auswertung in kleineren Unterabschnitten des Leberlobulus zwischen P.S. und T.H.V. (Topik)

Von jedem der 10 Unterabschnitte des Leberlobulus wurden die mit 8 und mehr Silberkörnern markierten Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen gesondert gewertet (MS = 8 SK). Für die weitere Untersuchung wurden daraus vier Bereiche ausgewählt: Die Zonen 2 und 3, 5 und 6, 8 und 9, jeweils zu einer Einheit verbunden durch Zusammenfassung gleicher Mitosestadien, und getrennt davon der Unterabschnitt 10. Von jedem dieser vier Bereiche konnten nun, noch unterteilt nach den einzelnen Mitosestadien, die Fraktion markierter Mitosen als Funktion der Zeit nach $^3\text{H-TdR}$ -Injektion aufgetragen werden. Getrennt für jeden dieser Bereiche 2 und 3, 5 und 6, 8 und 9 sowie 10 wurden damit die in je einer Graphik zusammengefaßten FLM-Kurven von Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen, wie unter I. 4. beschrieben, konstruiert (Abb. 12). Anschließend folgte in allen vier Darstellungen die Bestimmung der Zeitabstände zwischen den Kurven bzw. den zusätzlichen Meßpunkten der einzelnen Mitosestadien bei $\frac{n_M^+}{n_M} = 0, 0,5 \text{ und } 1,0$ (wie in II. 2.2.1. für das gesamte $\frac{n_M^+}{n_M}$ Leberläppchen beschrieben).

2.2.3. Zusammenfassende Darstellung der Dauer der Mitose und ihrer Teilabschnitte in Abhängigkeit von der Lage der Mitosen im Acinus. Vergleich mit den Werten für den gesamten Lobulus

Die in II. 2.2.2. gemessenen zeitlichen Abstände zwischen den FLM-Kurven der einzelnen Mitosestadien und das Intervall zwischen den Kurven von Pro- und Telophasen wurden, in Abhängigkeit von der Lage der ausgewerteten Bereiche im Acinus, in eine gemeinsame Darstellung der Topik der Mitosedauer eingetragen. Die entsprechenden Werte bei ge-

meinsamer Wertung aller 10 Zonen ohne Berücksichtigung der unterschiedlichen Lage der Mitosen im Läppchen (bestimmt in II. 2.2.1.) konnten dann zum Vergleich gegenübergestellt werden (Abb. 13).

3. Ergebnisse

3.1. FLM-Kurven für Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen für den gesamten Leberlobulus zwischen P.S. und T.H.V. ("Summenkurven") (Abb. 11)

Die Werte von $\frac{n_M^+}{n_M}$ für Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen erscheinen bei den einzelnen Versuchszeitpunkten in größtmäßig weitgehend geregelter Folge. Für alle vier Teilstadien treten zwischen 2,5 und 3,5 Std. nach $^3\text{H-TdR}$ -Verabreichung in regelmäßigen, kurzen Zeitabständen die ersten markierten Mitosen auf. Nach Verlängerung der ansteigenden Kurvenschenkel (siehe II. 2.2.1.) markieren die Schnittpunkte auf der Abszisse für Pro- bis Telophase eine Zeitspanne von rund 38 Minuten. Die Abstände von Pro- zu Metaphase, Meta- zu Anaphase und Ana- zu Telophase schwanken jeweils zwischen 11 und 14 Minuten.

Die geradlinigen ansteigenden Schenkel der 4 FLM-Maxima verlaufen, ausgenommen die etwas steilere Prophasenkurve, nahezu parallel zueinander. Bei $\frac{n_M^+}{n_M} = 0,5$ beträgt der Abstand von Pro- zu Telophasenkurve 51,1 Minuten. Zwischen Pro- und Metaphase werden 20,4, bei Meta- und Anaphase 15,9 und bei Ana- und Telophase 14,8 Minuten gemessen. Die bis zu den zusätzlichen Meßpunkten bei $\frac{n_M^+}{n_M} = 1,0$ verlängerten ansteigenden FLM-Kurvenschenkel begrenzen von Pro- zu Telophase einen Zeitabschnitt von rund 65 Minuten. Das Intervall von Pro- zu Metaphase ist hier etwa doppelt so groß wie das von Meta- zu Anaphase oder Anaphase zu Telophase.

Der Anstieg der FLM-Kurven der einzelnen Mitosestadien geht jeweils über in den etwas abgerundeten Gipfel, dessen Mitte zwischen 7 und 8,5 Std. nach ^3H -TdR-Injektion erreicht wird; die Fraktion markierter Mitosen zeigt bei den einzelnen Phasen dabei Werte um 0,95. Beim sich anschließenden, allgemein flacheren, absteigenden Schenkel weichen die einzelnen FLM-Kurven zunehmend auseinander; nur Meta- und Anaphasenkurve liegen noch annähernd parallel. Auch die Abstände der einzelnen Ergebnispunkte zur FLM-Kurve des betreffenden Mitosestadiums sind am ansteigenden Schenkel gering; am Gipfel und beim abfallenden Schenkel werden sie meist deutlich größer.

3.2. FLM-Kurven für Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen in kleineren Unterabschnitten des Leberlobulus (Topik) (Abb. 12)

Die ersten markierten Zellen der einzelnen Mitosestadien finden sich in den Bereichen 10, 8 + 9, und 5 + 6 2,5 Std., in den Abschnitten 2 + 3 3,5 Std. nach ^3H -TdR-Applikation. Der sich jeweils daran anschließende geradlinig ansteigende Schenkel der Prophasen-FLM-Kurve folgt kurz nach 2,5 Std. als erstes im Bereich 10; in 8 + 9 beginnt er nur wenig, über 5 + 6 bis 2 + 3 dagegen zunehmend später. Die nach unten bis zum Schnitt mit der Abszisse verlängerten ansteigenden Schenkel begrenzen zwischen Prophasen und Telophasen im Bereich 8 + 9 das kürzeste Zeitintervall. In 10 und 5 + 6 ist es bereits deutlich größer und am längsten in 2 + 3. Die Abstände der einzelnen Mitosestadien (P - M, M - A, A - T) zueinander sind hier auf der Abszisse jeweils in 2 + 3 am größten; zwischen den übrigen Bereichen ist keine immer gleichbleibende größenmäßige Ordnung vorhanden. Die ansteigenden Schenkel aller 4 FLM-Kurven verlaufen in 8 + 9 fast völlig parallel. In den übrigen Bereichen wei-

chen sie zum Gipfel zu meist weiter auseinander. Bei $\frac{n_M^+}{n_M} = 0,5$ ist das Intervall zwischen Pro- und Telophasenkurve in 8 + 9 am kürzesten; in 5 + 6 und 10 ist es jeweils etwa gleich, aber schon erheblich größer als beim Minimum. Das Maximum des Intervalls findet sich in 2 + 3. Die jeweiligen Zeitabstände zwischen Pro- und Metaphase, Meta- und Anaphase, Ana- und Telophase sind bei den untersuchten Bereichen größtmäßig ebenso geordnet.

Die bei $\frac{n_M^+}{n_M} = 1,0$ aus den FLM-Kurvenschaften bestimmten Punkte ergeben für den Abstand von Pro- zu Telophasen wiederum dieselbe Größenverteilung zwischen den vier Bereichen wie bei 0 und 0,5, wo jeweils in 8 + 9 die kürzeste, in 10 wie in 5 + 6 eine etwa gleiche, aber schon längere Zeitspanne und in 2 + 3 das Maximum gemessen wurde. Die Zeiträume zwischen den einzelnen Teilstadien lassen die gleiche größtmäßige Reihung innerhalb der einzelnen Bereiche nicht immer erkennen.

Ein deutliches Gipfelplateau für die FLM-Maxima aller Mitosestadien besteht nur im Bereich 8 + 9. In allen 4 ausgewerteten Läppchenbereichen erreichen diese Gipfel markierter Mitose-Teilphasen Werte von $\frac{n_M^+}{n_M} = 0,95$. Die sich anschließenden absteigenden Kurvenschenkel verlaufen in allen Punkten weniger geordnet als die ansteigenden. Zum Teil weichen die Kurven zunehmend auseinander, ebenso kommt es auch zu gegenseitigen Berührungen. Am Ende des Abstiegs gehen die vorher weitgehend regelmäßigen Zeitunterschiede der Mitosephasen verloren. Die Streuung der FLM-Punkte um die Mittelage der Kurve ist in 8 + 9 am geringsten, in 5 + 6 und 10 merklich größer, und in 2 + 3 relativ stark.

3.3. Zeitdauer der Mitose und bestimmter Teilabschnitte
in Abhängigkeit von der Lage der Mitosen im Leber-
lobulus. Vergleich mit den Werten für den gesamten
Acinus (Abb. 13)

Das Zeitintervall zwischen FLM-Kurven für Pro- und Telo-
phasen hat portal im Bereich 8 + 9 ein Minimum; inter-
mediär (in 5 + 6) wird dieser Zeitraum deutlich größer
und erreicht in 2 + 3 schon das Doppelte der Werte für
8 + 9. Unmittelbar periportal, im Bereich 10, ist dieser
Abstand von Pro- zu Telophasen ebenfalls erheblich länger
als in den zur T.H.V. zu angrenzenden Zonen und nahezu
gleich wie intermediär im Bereich 5 + 6.

Die Zeiträume zwischen den Teilstadien Pro- und Metaphase,
Meta- und Anaphase, Ana- und Telophase sind im Bereich
8 + 9 jeweils am kürzesten. Wiederum sind die einzelnen
Distanzen unmittelbar periportal in 10 und in 5 + 6 etwa
gleich groß, aber schon erheblich länger als beim Minimum.
Am größten sind die Abstände der einzelnen Mitosestadien
venös in 2 + 3.

Die Zeitspanne zwischen Pro- und Metaphase ist in 8 + 9
und 2 + 3 länger, in 5 + 6 gleich und in 10 etwas kürzer
als die zwischen Meta- und Anaphase. Der Abstand von Ana-
zu Telophase bleibt in allen Bereichen immer der kürzeste.

Bei gemeinsamer Wertung der Mitosephasen des gesamten Leber-
lobulus (= Σ in Abb. 13) von Zone 1 - 10 ohne Berücksich-
tigung der Topik, ergibt sich ein Intervall von Pro- bis
Telophase, das verglichen mit Bereich 5 + 6 oder 10 nur
wenig, gegenüber 2 + 3 jedoch stark verkürzt ist; es bleibt
dagegen erheblich größer als der entsprechende Wert von
8 + 9. Die Zeitabstände zwischen den jeweils aufeinander-
folgenden Mitosestadien liegen beim Bereich 10 und bei
5 + 6 nur gering über oder unter den entsprechenden Werten
vom gesamten Leberlobulus. In 8 + 9 sind sie immer kürzer,

in 2 + 3 immer länger als die Phasenabstände für die Gesamtleber ohne Berücksichtigung der Topik.

4. Diskussion

4.1. Zur Bestimmungsmethode der mittleren Mitosedauer und ihrer Teilphasen aus FLM-Kurven der einzelnen Mitosestadien

Bei Zählung von Mitosen oder einzelner Teilstadien ist die Abgrenzung des Mitosebeginns schwierig, da der Übergang von der Interphase zur Zellteilung unscharf (Mazia 1961, Grundmann 1971) und deshalb nur schwer festzulegen ist. Einfluß auf die Bewertung haben die Untersuchungsbedingungen. Im histologischen Schnitt etwa wird eine Prophase erst identifizierbar, wenn sie bereits voll ausgebildet ist (Grundmann 1971); auch das Ende der Mitose zwischen Kondensation der Chromosomen in der Telophase und der sich anschließenden Rekonstruktion ist nicht immer exakt faßbar (Grundmann 1971). Deswegen wählt man für die Auswertung möglichst deutlich sichtbare Grenzen, z.B. die stärkere Kondensation der Chromatinfilamente in der Prophase, bzw. das Ende der Chromatinauflockerung in der Telophase (Fry et al. 1961 a).

Die Einordnung von Prophasen erst von einer schon stärkeren Kondensation der Chromosomen ab mit Auflösung der Kernmembran und Schwinden des Nucleolus entspricht eigentlich schon der Prometaphase. Dieses Spätstadium der Prophase wurde trotzdem in den beschriebenen Versuchen als Beginn gewählt, weil bei starker Silberkornmarkierung des Zellkerns nur verdichtete Chromosomen und fehlende Kernmembran die Mitose einwandfrei erkennen lassen. Das Ende der Telophase wird entsprechend durch die auch bei höherer SKD noch gut sichtbare erste Auflockerung der Chromosomen festgelegt.

Schwierigkeiten bei der Abgrenzung entstehen vereinzelt durch die besonders nach Teilhepatektomie häufiger auftretenden Mitosestörungen (Altmann 1966, Fabrikant 1967 d, Klinge 1968): pathologische Teilungsfiguren können falsch eingeordnet werden und tragen möglicherweise zur Fehlmessung der eigentlichen Mitosedauer bei.

Durch Aufteilung der Mitosen einer einzigen Zone des Leberlobulus in die verschiedenen Teilphasen wird die absolute Zellzahl eines Mitosestadiums relativ gering und folglich die Aussagekraft der FLM-Werte reduziert (bzw. Streuung der Einzelwerte deutlicher). Deshalb empfiehlt es sich, zur gesonderten Betrachtung kleiner, verschieden lokalisierter Bereiche des Lobulus aus unmittelbar benachbarten Zonen, hier in 2 + 3, 5 + 6 und 8 + 9, gleiche Mitosestadien zu einer repräsentativen Anzahl von Zellen zusammenzufassen. Die aus den zugehörigen FLM-Kurven eines solchen kleinen Bereichs abgelesenen Zellzyklusparameter sind dann Durchschnittswerte für alle Zellen in den beiden benachbarten Zonen. Lediglich Abschnitt 10 wurde wegen der in Absatz II. festgestellten beständigen Sonderstellung der unmittelbar periportal gelegenen Zellen allein ausgewertet.

Die nebeneinander gelegenen FLM-Kurven von Pro-, Meta-, Ana- und Telophase verlaufen, wohl aus methodischen Gründen, nicht immer völlig parallel zueinander. Durch dieses sich Nähern oder stärkere Auseinanderweichen der einzelnen Kurvenlinien ergeben die Messungen bei $\frac{n_M^+}{n_M} = 0$ und 1,0 sehr unterschiedliche Zeitabstände.

Deswegen ist eine Bestimmung der Zeitabstände zwischen den FLM-Kurven der einzelnen Mitosestadien günstiger bei $\frac{n_M^+}{n_M} = 0,5$ am ansteigenden Schenkel des FLM-Gipfels.

Das Zeitintervall zwischen den einzelnen FLM-Kurven hat hier gegenüber 0 oder 1,0 immer eine mittlere Dauer und wird auch von der zueinander wechselnden Neigung der einzelnen ansteigenden Kurvenschenkel kaum beeinflusst.

Distanzen zwischen FLM-Kurven der Mitosestadien werden mitunter als Zeitdauer der betreffenden Teilphase, z.B. der Abstand Meta- zu Anaphasen-FLM-Kurve als Metaphase, interpretiert (Post et al. 1963). Die FLM-Werte der einzelnen Versuchszeitpunkte, z.B. für Metaphasen, ergeben sich aber aus der gemeinsamen Wertung sowohl früher Metaphasen, aller in der Mitte der Metaphase befindlichen Zellen bis einschließlich der späten Formen, die unmittelbar vor dem Übergang in die Anaphase stehen. Aus den jeweiligen Summen dieser Zellen berechnete FLM-Punkte und die daraus erstellte FLM-Kurve markieren dann den mit der Versuchszeit wechselnden Anteil markierter "Durchschnitts"-Metaphase-Figuren, etwa in der Mitte ihres Teil-Phasenablaufs. Das Intervall von Meta- zu Anaphasen-FLM-Kurve kann also nicht den Zeitpunkt von Beginn und Ende der Metaphase begrenzen. Deren eigentlicher Beginn liegt, zeitlich hier aus der Graphik nicht näher bestimmbar, zwischen Pro- und Metaphasen-FLM-Kurve, das Ende entsprechend zwischen Meta- und Anaphasen-Kurve. Ebenso ist der eigentliche zeitliche Beginn der gesamten Teilungsphase wohl auch nicht durch die Prophasenkurve gekennzeichnet, sondern liegt zeitlich früher; das Ende der Mitose folgt, analog dazu, später, als hier die FLM-Kurve der Telophasen anzeigt. Die Zeitspanne von Pro- zu Telophasen-FLM-Kurve stellt dann nicht die gesamte mittlere Mitosezeit der Hepatocyten dar, wie sie z.B. bei einer direkten Beobachtung der Zellteilung meßbar wäre, sondern einen am Anfang und Ende etwas gekürzten Ausschnitt. Eine weitere Kürzung der hier meßbaren Mitosezeit gegenüber der wahren Teilungsdauer der Hepatocyten bringt die Auswertungsmethode, bei der wegen der besseren Erkennbarkeit die Mitosen erst ab später Prophase ausgezählt wurden. Da jedoch die direkte Betrachtung der Zellteilung an der regenerierenden Leber in vivo nicht möglich ist, kann die indirekte Bestimmung aus dem Zeitintervall von Pro- zu Telophasen-FLM-Kurve als Vergleichsmaß für die mittlere

Mitosedauer (ausschließlich der frühen Prophase), verwendet werden.

Die Zeitabstände zwischen den FLM-Kurven von Pro-, Meta-, Ana- und Telophase, die ja n i c h t Anfang und Ende einer Phase markieren, erlauben zwar keine direkte Angabe über die Dauer der einzelnen Teilphasen. Sie eignen sich jedoch für die Untersuchung, wie sich gleichartige Unterabschnitte der Mitose, nicht identisch mit Teilphasen, unter wechselnden Bedingungen, wie z.B. als Funktion der Topik im Lobulus, verändern.

4.2. Einordnung der gemessenen Zeitintervalle

4.2.1. Für den gesamten Leberlobulus o h n e Berücksichtigung der Topik

Der Abstand von Pro- zu Telophasenkurve für den gesamten Leberlobulus zwischen P.S. und T.H.V., (o h n e Rücksicht auf die Topik), als t_M mittel bezeichnet, beträgt 51 Minuten.

Die durchschnittliche Teilungsdauer ist damit weitaus kürzer als der in I. für die gleiche Zellpopulation gemessene Maximalwert ($t_{M \max}$) von rund 2,2 Stunden. Die gleichen Angaben zu solchen verschiedenen Mitosedauern bei Leber und Niere (Stöcker und Heine 1965 a, Stöcker und Pfeifer 1967) sind somit hier bestätigt worden. Ein direkter Vergleich mit Mitosezeiten anderer Untersuchungen wird jedoch behindert durch die Schwierigkeit, Anfang und Ende der Mitose quantitativ zeitlich festzulegen (Mazia 1961, Grundmann 1971), weshalb selbst bei gleicher Zellart und sehr ähnlichen Bedingungen oft sehr unterschiedliche Teilungszeiten berechnet werden. Die angegebenen Mitosezeiten der regenerierenden Leber von vergleichbar alten Ratten von 45 - 60 Minuten (Brues and Marble 1937, Cater et al. 1956, Edwards

and Koch 1964, Fabrikant 1967 a, Fabrikant 1968, Grisham 1969) oder 1 - 1,5 Stunden (Stöcker und Pfeifer 1967) zeigen dennoch eine gute Übereinstimmung mit unserem Maß für t_M mittel.

Direkt gegenüberzustellen sind nur Mitosezeiten etwa gleichalter, gleichbehandelter Tiere, denn Altersunterschiede bewirken zum Teil große Zeitunterschiede: senile Tiere zeigen nach Hepatektomie eine Mitosedauer von 1,5 Std. (Heine und Stöcker 1970); dagegen erhält man im schnell proliferierenden Gewebe der Leber von Ratten am 1. Lebenstag schon ohne Hepatektomie ein t_M mittel von 0,3 Std. (Post and Hoffman 1964).

Beide Zeiten wurden, wie im eigenen Versuch, aus dem Abstand Pro- zu Telophasen-FLM-Kurve bestimmt. Bei unbehandelten, 3 bis 8 Wochen alten Tieren werden aber schon wieder 1,7 Std. (Post and Hoffman 1964), 3,0 Std. (Post et al. 1965) oder 1,5 Std. (Schultze and Maurer 1972) für die Mitose berechnet; die Teilungsphase dauert damit dort schon deutlich länger als die hier, bei den etwa 8 Wochen alten Ratten, nach Hepatektomie und Umschaltung auf schnellen Proliferationsmodus (Stöcker 1966) gemessene Zeit. Die mittlere Mitosedauer der hier verwendeten Tiere liegt post operationem sogar unter den Zeiten von je 1,5 Stunden bei jugendlichen Leberzellen in Kultur (Rabes und Jantsch 1971) und den Zellen einer schnell proliferierenden Geschwulst wie des DÄNA-Hepatoms (Rabes 1969).

Die nach Teilhepatektomie auftretenden (Altmann 1966, Klinge 1968) und sich im Alter verstärkenden (Klinge 1968, Heine und Stöcker 1970) Mitosestörungen verursachen möglicherweise Teilungsverzögerungen. Bei einzelnen Zellen könnte das erheblich längere maximale Mitosedauern ergeben, was sich bei senilen Ratten mit Mitosedauern von 15 Std. und mehr (Heine und Stöcker 1970) bestätigt.

Bei der Rattenleber sind Zeitangaben über Prophase (1,5 Std.

bzw. 0,52 Std.) und Metaphase (1,0 bzw. 0,84 Std.) erheblich länger als die von Ana- (0,4 Std. bzw. 0,11 Std.) und Telophase (0,3 bzw. 0,23 Std.) (Post et al. 1963, Post and Hoffman 1964). Mit dem hier bestimmten Zeitintervall zwischen Pro- und Metaphasen-FLM-Kurve von 0,34 Std., während dessen Ablauf wohl der eigentliche Übergang von Pro- zu Metaphase erfolgt (vgl. 4.1.), sind folglich Zeitanteile von Pro- u n d Metaphase gemessen. Die 0,24 Std. von Ana- zu Telophasenkurve deuten auch hier die kürzeren, späteren Teilphasen der Mitose an. Genaue Zeitverhältnisse der verschiedenen Mitosestadien zueinander lassen sich aus den FLM-Kurvenabständen aber nicht ablesen.

4.2.2. Für kleine Bereiche des Leberlobulus (T o p i k)

Das aus dem gesamten Leberlobulus bestimmte t_M mittel von 51,1 Minuten ist kein auf alle Leberzellen tatsächlich zutreffender Wert. Der Vergleich mit den Zeitabständen zwischen den FLM-Kurven von Pro- und Telophasen aus verschiedenen lokalisierten Unterabschnitten des Leberlobulus zeigt, daß die 51 Minuten nur ein Durchschnittswert sind, der sich aus regional erheblich unterschiedlichen Teilungsdauern zusammensetzt. Dem portal kürzesten t_M mittel von 40 Minuten in 8 + 9 steht mit den 81 Minuten vom venösen Bereich 2 + 3 eine mehr als doppelt so lange mittlere Mitosezeit gegenüber: das zonale Verhalten der mittleren Mitosezeiten innerhalb des Acinus ist damit gleich wie bei den wesentlich längeren maximalen Mitosezeiten, wo durchschnittlich für die Zonen 8 + 9 1,57 Std. bzw. 2,97 Std. für 2 + 3 gemessen werden. Die Zone 10 besitzt, bei einem Prophasen-Telophasen-Intervall von 57 Minuten, eine gegenüber 8 + 9 erheblich verzögerte Zellteilung. Sie ist damit zeitlich nahezu gleich wie bei Zellen aus dem intermediären Bereich (5 + 6) und liegt sogar gering über dem Durchschnittswert

für die Gesamtleber (vgl. $\sum 1 - 10$ in Abb. 13). Diese Sonderstellung der unmittelbar periportal gelegenen Zellen zeigte sich schon durch eine verzögert einsetzende DNA-Synthese nach Hepatektomie im Vergleich zu den angrenzenden Zellen (Rabes und Tuczek 1967, Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970) und aus den in Absatz II. mitgeteilten Zellzyklusphasen.

Die Änderung bestimmter Teilabschnitte der Mitose bei verschiedener Lokalisation der Zellen im Acinus, hier ersichtlich aus den Zeitabständen zwischen den FLM-Kurven der einzelnen Mitosestadien, erfolgt im Leberlobulus zwischen P.S. und T.H.V. gleichartig wie schon bei den maximalen und mittleren Mitosedauern: Die Verdoppelung des Prophasen-Telophasen-Intervalls von Bereich 8 + 9 nach 2 + 3 geht einher mit einer gleichzeitigen annähernden Verdoppelung der Zeitabstände von Pro- zu Meta-, Meta- zu Ana- und Ana- zu Telophasen. Ebenso sind in 10 und 5 + 6, wie schon das Intervall Pro- zu Telophase, auch die einzelnen Unterabstände nahezu gleich groß.

Ein im ganzen Acinus konstant bleibender Wert eines oder zweier Kurvenabstände zwischen den Teilstadien-FLM-Kurven, bei alleiniger Variation des dritten je nach Lokalisation der Zellen, liegt nicht vor. Möglicherweise deutet das an, daß sich die einzelnen Mitosestadien Pro-, Meta-, Ana- und Telophase durch Wechsel der Lage im Lobulus *a l l e*, eventuell sogar zu gleichen Anteilen, zeitlich verändern.

Die Ursache der topisch charakteristischen Unterschiede der mittleren Mitosezeit, bzw. des als Maß verwendeten Prophasen-Telophasenabstandes, und die Änderung der Distanzen zwischen den FLM-Kurven der Mitosestadien ist in dem Wechsel von innerem Aufbau und äußerem Milieu der Hepatocyten je nach Lage der Zellen im Lobulus zu suchen (siehe Absatz II.). Die sich mit der Lokalisation der Zellen innerhalb des Acinus verändernden Teilungsbedingungen beeinflussen maxi-

male und mittlere Mitosedauern sowie bestimmte Teilabschnitte der Mitose in gleicher Weise. Eine dazu vergleichbare Lageabhängigkeit der Zellteilungsgeschwindigkeit findet man auch an anderen Zellsystemen: Mitosezeiten werden z.B. bei *Allium cepa* umso kürzer, je näher die Zellen an der Wurzelspitze liegen (Lopez-Saez et al. 1966).

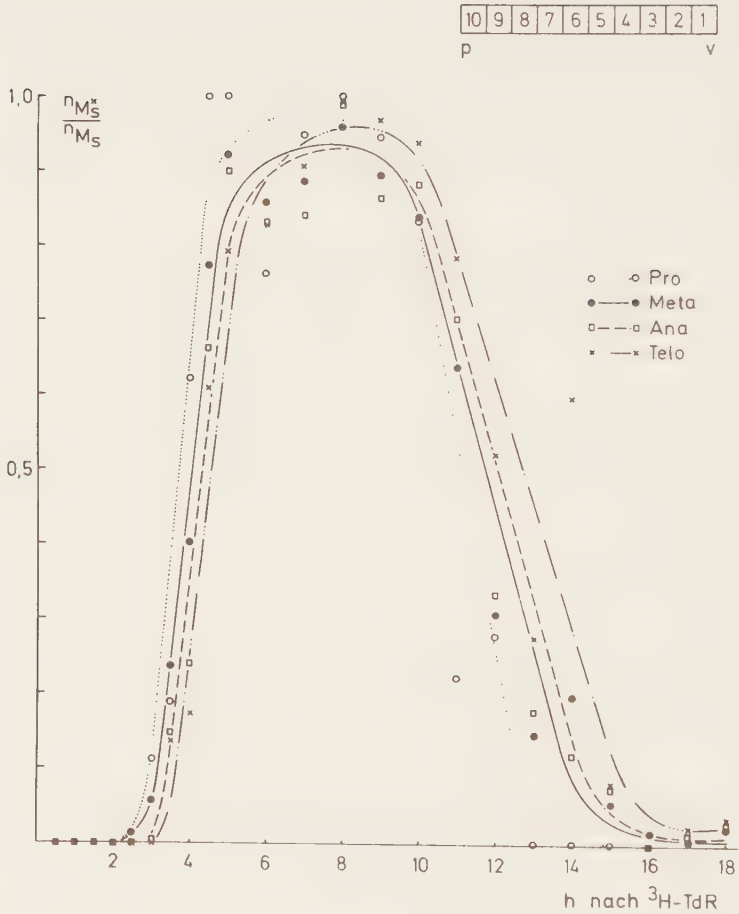


Abb. 11: Fraktion markierter Mitosen für die Teilphasen Pro-, Meta-, Ana- und Telophase (Ordinate) als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von $^3\text{H-TdR}$ (Abszisse) im gesamten Leberlobulus ohne Berücksichtigung der Lokalisation der Zellen ("Summenkurven").

zeitliche Abstände der FLM-Kurven
von Pro-, Meta-, Ana- und Telophase

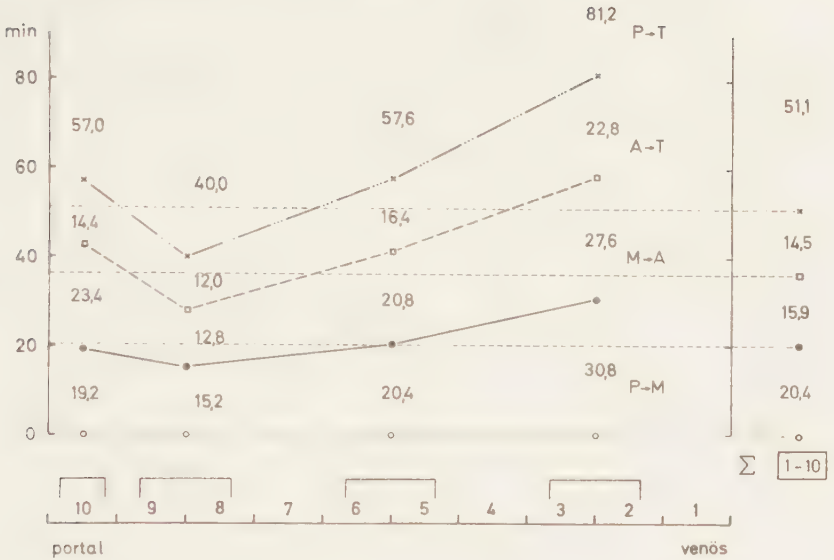


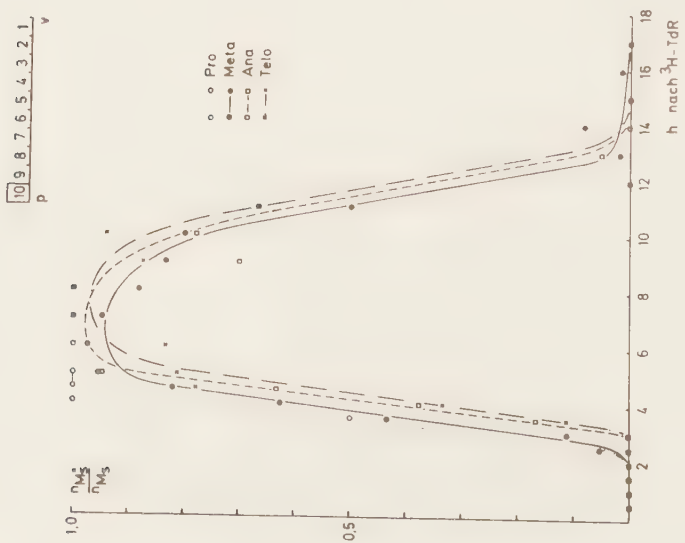
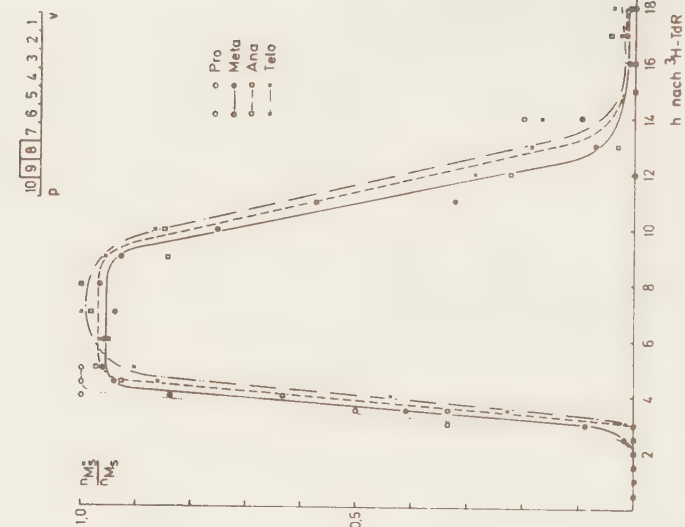
Abb. 13: Zeitlicher Abstand bei $\frac{n_{M+}}{n_M} = 0,5$ zwischen dem

ansteigenden Schenkel der Prophasen-FLM-Kurve und dem der Meta-, Ana- bzw. Telophasenkurve (Ordinate) in Abhängigkeit von der Lokalisation des ausgewerteten Bereichs im Lobulus (Abszisse).

○ — ○ : Prophasen, ● — ● : Metaphasen,
□ — □ : Anaphasen, × — × : Telophasen;

In jedem Wertungsbereich sind zusätzlich die jeweils zwischen 2 benachbarten FLM-Kurven gemessenen zeitlichen Abstände (P→M, M→A, A→T) bzw. der Abstand von Pro- zu Telophasenkurve (P→T) angegeben.

An der rechten Seite der Graphik finden sich jeweils die entsprechenden Werte für das gesamte Leberläppchen ($\Sigma 1 - 10$) ohne Berücksichtigung der Topik.



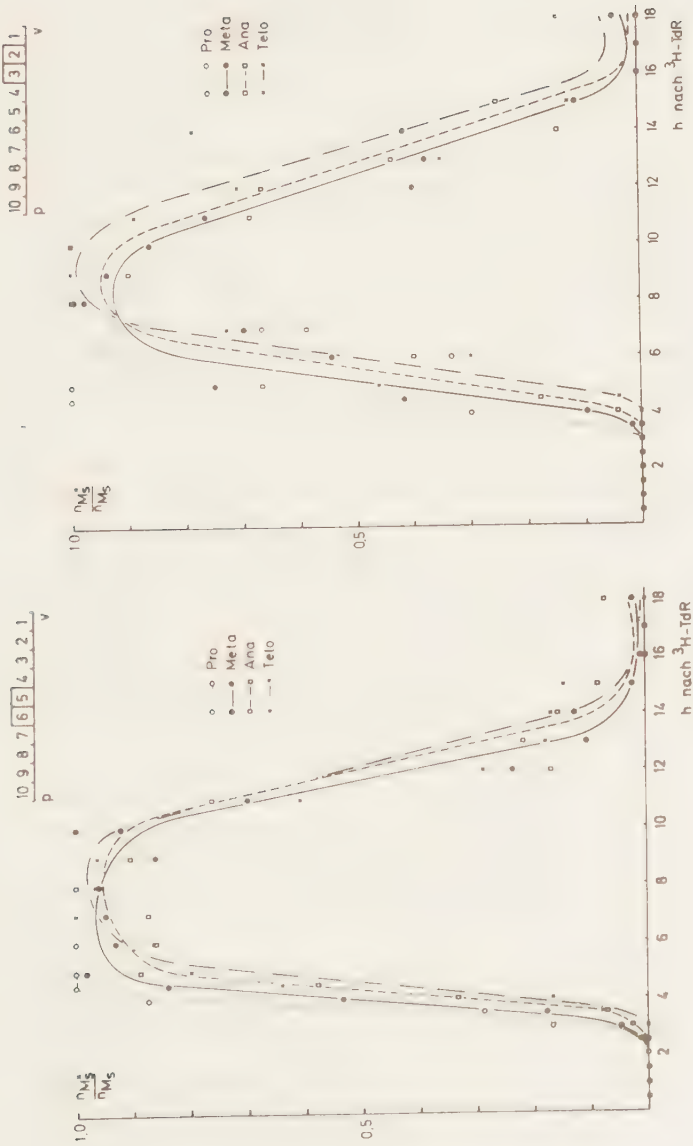


Abb. 12: Fraktion markierter Mitosen für die Teilphasen Pro-, Meta-, Ana- und Telophase (Ordinate) als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von 3H -TdR (Abszisse) für 4 ausgewählte Lobulusbereiche, die jeweils durch Umräumung der Nummern der betreffenden Zonen gekennzeichnet sind.

IV. BEDEUTUNG VON BACKGROUND, SILBERKORNZAHL ÜBER MITOSEN UND DER AUSWERTUNGSTECHNIK BEI BESTIMMUNG VON ZELLZYKLUSPARAMETERN MIT DER FILM-METHODE

1. Literaturübersicht

Nach Injektion von ^3H -TdR erfolgen sowohl Verteilung wie Abbau im Organismus sehr rasch (Chang and Looney 1965, Pelc and Appleton 1965). Ebenso schnell läuft auch der Einbau des angebotenen Vorläufers in DNA-synthetisierende Kerne ab (Rubini et al. 1960). Das Tritium des injizierten ^3H -TdR erscheint innerhalb einer Stunde nahezu vollständig in der DNA oder als tritiiertes Wasser (Rubini et al. 1960, Steel and Lamerton 1965). Wegen der Verfügbarkeitszeit des markierten Vorläufers von 40 - 60 Minuten (Hughes et al. 1958, Rubini et al. 1960, Koburg und Maurer 1962, Wegener et al. 1964, Chang and Looney 1965), besteht keine ideale Pulsmarkierung der DNA-synthetisierenden Zellen beim Injektionszeitpunkt. Auch solche, die während dieser Markierungsperiode erst in die S-Phase einlaufen, werden noch markiert (Wimber 1965). Insgesamt ist der prozentuale Anteil des exogenen TdR, bezogen auf das gesamte DNA-TdR, an der DNA-Synthese sehr gering (Lang et al. 1966, Lang et al. 1968). Auch nur wenige Prozent (8 - 10) des applizierten TdR werden im Organismus in neugebildete DNA eingebaut (Hinrichs et al. 1964, Chang and Looney 1965, Schultze 1968). Einzelne Untersuchungen deuten auch auf einen kleinen TdR-Pool, der über die Synthesephase hinaus bestehen bleibt (Steel and Lamerton 1965, Stone et al. 1965).

Bei der Autoradiographie steigt die Dichte der SK-Markierung linear mit der Zahl der auf die Emulsion auftreffenden Teilchen (Schultze 1968). Die zu messende SK-Zahl wird dabei besonders von Faktoren wie Poolgröße des Vorläufers, Art des Filmes und der Autoradiographietechnik

beeinflusst. (Literatur-Übersicht bei Schultze 1968). Sie nimmt zu bei Verlängerung von Expositionszeit (Pelc 1957, Kopriwa and Leblond 1962, Koburg 1963, Shackney et al. 1973) oder Entwicklungszeit (Moore 1971). Quantitative SK-Zahlungen, z.B. über Mitosen, werden beeinträchtigt, wenn ein Verschwinden latenter Bilder (Fading) auftritt (Schultze 1968). Selbstbestrahlung und Zerfall von ^3H -TdR kann zu Minderung der SKD führen (Wand et al. 1967). Auch die annähernde Halbierung der SKZ über markierten Zellen bei jeder Zellteilung (Oehlert und Buchner 1961, Grisham 1962, Post and Hoffman 1964, Helpap und Cremer 1972, Schultze and Maurer 1972) begrenzt die Anwendbarkeit der autoradiographischen Methode.

Bedingt durch die geringe mittlere Reichweite der β -Strahlung des Tritiums von etwa $1\text{ }\mu\text{m}$ bei Masse 1 trägt insgesamt nur eine sehr dünne Schicht (ca. $1\text{ }\mu\text{m}$) des histologischen Schnitts zum autoradiographischen Bild bei (Schultze 1968). Wegen der β -Selbstabsorption der radioaktiven Strahlung erscheinen tiefer im Schnitt gelegene, eigentlich ^3H -TdR-markierte Strukturen weniger oder gar nicht markiert, da die SKZ mit zunehmender darüberliegender Schichtdicke, größenmäßig beeinflusst von der Masse derselben, sehr rasch absinkt (Grisham 1962, Maurer und Primbsch 1964, Schultze 1968). Auch bei weiter erhöhter Dicke des histologischen Schnitts steigt ab bestimmten Grenzwerten (ca. $0,5\text{ }\mu\text{m}$) die SKD über markierten Strukturen nicht mehr an, sondern bleibt konstant (Maurer und Primbsch 1964).

Insgesamt zeigen die Silberkorndichten über markierten Zellen charakteristische Häufigkeitsverteilungskurven zwischen minimalen und maximalen Silberkornzahlen (Koburg 1963).

Methodisch bedingten geringen SK-Zahlen über echt in S ^3H -TdR-markierten Zellen stehen "falsch" positiv, d.h. markiert erscheinende, allein durch Artefakte oder Nulleffekt markierte Zellen gegenüber, die bis zu einem gewissen Maß in jeder autoradiographischen Emulsion unvermeidlich sind (Pelc 1957). Der Background umfaßt dabei SK in der auto-

radiographischen Schicht, die nicht von den ionisierenden Teilchen der beobachteten Quelle herrühren (Sawicki et al. 1971) und auch über eigentlich unmarkierten Strukturen liegen können (Pelc 1957). Sie werden verursacht durch Temperaturerhöhung, kosmische Strahlung, langwelliges Licht, elektrostatische Ladungen, Druck, etc. (Quastler and Sherman 1959, Schultze 1968). Wie die echte SK-Markierung steigt auch der Background mit der Expositionszeit an (Grisham 1962, Schultze 1968). Über Gewebe ist er signifikant höher als über gewebefreien Arealen (Sawicki et al. 1971), ebenso über Gewebe ^3H -TdR-injizierter Tiere als über solchem ohne ^3H -TdR. Insgesamt bleibt aber die SK-Markierung von Zellen durch Background-Effekte relativ schwach (Bryant 1962, Post et al. 1963).

Weil falsch positive Zellen die Ergebnisse der Zählung von SK bzw. markierten Zellen bei der quantitativen Autoradiographie sehr stark beeinflussen, werden deshalb die Schnitte oft nach niederem BG ausgewählt, oder solche mit stärkerem Nulleffekt nicht berücksichtigt (Bryant 1962, Stöcker und Heine 1965 b, Stöcker und Pfeifer 1967, Fabrikant 1967 d, Fabrikant 1968). Andererseits versucht man bei Auswertung diese störenden, meist schwacher markierten, falsch positiven Zellen, bzw. fälschlich hohen SK-Zahlen durch Korrekturberechnungen (Sawicki et al. 1971) oder einfache Subtraktion auszuschließen (Pelc 1957, Bryant 1962, Shackney, Ford and Wittig 1973); die Abgrenzung bleibt aber oft willkürlich (Sawicki et al. 1971).

Die aus unterschiedlichsten Versuchsanordnungen als gesichert anzusehende Wiederverwendung, bzw. Reutilisation radioaktiv markierter DNA-Kataboliten (bzw. Vorläufer) (Diderholm et al. 1962, Bryant 1962, Bryant 1963 a, Bryant 1963 b, Fichtelius and Groth 1963, Bryant 1965, Steel and Lamerton 1965, Stone et al. 1965, Feinendegen et al. 1966), führt zu einer radioaktiven Markierung von

Zellen nicht unmittelbar beim, sondern in einigem Abstand vom Zeitpunkt der ^3H -TdR Injektion. Mehrere verschiedene Markierungsmechanismen sind dabei zu unterscheiden (Steel and Lamerton 1965). Die reutilisierte DNA stammt aus abgestorbenen Zellen (Bryant 1963 b, Bryant 1965), wobei insgesamt 35 - 40% der einmal markierten DNA wieder verwendet werden (Feinendegen et al. 1966). Die reutilisierten DNA-Bruchstücke sind vornehmlich niedermolekular (Bryant 1962, Bryant 1963 b, Schultze 1968). Wie die eigentliche ^3H -Markierung zum Zeitpunkt der Injektion des radioaktiven Vorläufers erfolgt auch die Markierung durch Reutilisation ausschließlich in der DNA-Synthesephase der Zelle (Bryant 1962, Bryant 1963 b); sie führt aber nur zu schwacher Markierung der Zellen (Bryant 1962, Bryant 1963 b, Helpap et al. 1971).

Bei Zellen regenerierender Leber tritt z.B. eine radioaktive Kennzeichnung einige Zeit nach einer Infusion von vormarkierten Leuko- bzw. Lymphocyten auf (Bryant 1962, Bryant 1963 b); in Rändern künstlich gesetzter Parenchymwunden (Leber) erscheint sie bei länger vorhergehender ^3H -Markierung des Tieres (Helpap et al. 1971). Auch in markierten Transplantaten zeigen sich etliche deutlich markierte Kerne bei den eingewanderten Empfängerzellen (Fichtelius and Groth 1963). Eine stärkere SK-Markierung der Zellen durch Reutilisation markierter DNA-Vorläufer tritt erst längere Zeit nach der erstmaligen ^3H -Inkorporation, und damit auch nach dem Injektionszeitpunkt auf (Diderholm et al. 1962, Bryant 1962).

Insgesamt können Silberkörnchen über Zellkernen, bzw. Mitosen durch Background, Artefakte, Reutilisation, direkten Einbau von ^3H -TdR zum Injektionszeitpunkt oder durch gleichzeitig mehrere dieser Formen bedingt sein. Die für die FLM-Methode entscheidende Abgrenzung der "echt" ^3H -TdR-markierten von "falsch positiv" markierten Zellen

bereitet dabei oft Schwierigkeiten. Im allgemeinen versucht man die (wie oben erwähnt), meist schwach markierten, "falsch positiven" Mitosen durch eine mehr oder weniger willkürlich festgesetzte SK-Anzahl, bzw. Markierungsschwelle auszuschalten: Zellen mit weniger Silberkörnern über Kern bzw. Chromosomen werden nicht als markiert gewertet (z.B. Bryant 1963 b, Fabrikant 1967 c, Stöcker und Pfeifer 1967, Fabrikant 1968, Fabrikant 1969, Rabes 1969, Moore 1971, Hilscher et al. 1972).

Beim FLM-Verfahren bereitet die gut reproduzierbare und allen Ergebnispunkten gleichmaßen gerecht werdende Erstellung einer FLM-Kurve Schwierigkeiten. Durch einfaches Verbinden der einzelnen FLM-Punkte erhaltene Kurven sind zur Auswertung der Zellzyklusphasen weniger geeignet. So werden die Kurvenlinien meist nach individuellen, weitgehend empirischen Regeln durch die vorgegebenen Punkte gelegt. Zur besseren Anpassung an auch weniger ideal aufeinanderfolgende FLM-Werte wird die Kurvenlinie oft durch "Glättung" einem optimalen Verlauf angenähert (z.B. Hilscher et al. 1972). Die anschließende Entnahme der Zellzyklusparameter (aus der FLM-Kurve) folgt häufig mit einer je nach dem einzelnen Untersucher zumindest teilweise modifizierten Technik.

Mit ihrer größeren Unabhängigkeit gegenüber den jeweiligen individuellen Auswertungsmethoden dient die automatische Analyse von FLM-Werten der Bestimmung eines optimalen Kurvenverlaufs wie der Berechnung von Phasenlängen und ihren Standardabweichungen. Erste geeignete Computerprogramme wurden von Farret (1966) vorgeschlagen; zahlreiche erweiterte, verfeinerte und den biologischen Systemen besser angepasste Programme folgten (Takahashi et al. 1971, Steel and Haines 1971, Steel 1972, Gilbert 1972, u.a.).

2. Versuche

2.1. Versuchsanordnungen

Bei Tiermaterial, Operation, Injektion des DNA-Vorläufers, Anfertigung der histologischen Schnitte und Autoradiographien handelt es sich um die gleiche Anordnung wie unter I. 4.1. Die selben Objektträger, wie die darin nach Mitosestadium, Silberkornzahl und Lokalisation im Acinus differenzierten Hepatocyten wurden auch für die folgenden Versuchsauswertungen verwendet.

2.2. Bestimmung der Größe des Backgrounds in der Autoradiographie

Die Background-Bestimmung erfolgte an den gleichen, schon zur Auswertung der markierten Mitosen herangezogenen autoradiographischen Präparaten. Bei 625-facher Vergrößerung wurden mit einem Okularzählraster jeweils 25 flächengleiche Quadrate der Kantenlänge 42,6 μm in das Gesichtsfeld projiziert und nach Auszählung von 7500 dieser kleinen Quadrate die durchschnittlich auf deren Fläche treffenden Parenchymzellkerne berechnet.

Zur Festlegung der mittleren Kernfläche der Hepatocyten im histologischen Schnitt folgten bei 1250-facher Vergrößerung mit einem Okularmikrometer Messungen an 200 wahllos herausgegriffenen Parenchymzellkernen, deren Fläche aber mathematisch leicht faßbar sein mußte (Fläche Kreis = $\frac{1}{4} d^2 \cdot \pi$; Fläche Ellipse = $\frac{d_1}{2} \times \frac{d_2}{2} \cdot \pi$).

Von jedem Versuchszeitpunkt zwischen 0,5 Std. und 50 Std. nach ^3H -TdR-Injektion wurden aus 1 bis 3 Objektträgern die SKD bestimmt. Dazu wurden in jeweils 45 Quadraten der Kantenlänge 42,6 μm pro Objektträger alle nicht über den Parenchymzellkernen gelegenen Silberkörner ge-

zählt und daraus eine mittlere Silberkornzahl pro Quadrat berechnet. Die mittlere Silberkorndichte des Background ergibt sich dann aus mittlerer Silberkornzahl und entsprechender Bezugsfläche, d.h. aus der Fläche des Wertungsquadrats von $42,6 \mu\text{m}$ Kantenlänge und Subtraktion der darin im Durchschnitt von den Hepatocytenkernen beanspruchten Fläche. Sie wird in SK pro $1000 \mu\text{m}^2$ angegeben (siehe Abb. 14).

Aus der so bestimmten mittleren SKD des Background und der bereits bekannten durchschnittlichen Kernfläche wurde die Zahl von SK berechnet, die sich im Schnitt auf einer Fläche von der Größe des Kerns befinden.

2.3. FLM-Kurven für verschiedene Markierungsschwellen ohne Berücksichtigung der Lage der Mitosen im Leberlobulus ("Summenkurven")

Aus allen 10 Lobulus-Zonen wurden Mitosen mit gleicher Silberkornzahl über den Chromosomen zusammengefaßt, daraus für die Markierungsschwellen 1, 2, 3, 4, 5, 8 und 15 SK die jeweils entsprechenden FLM-Werte berechnet und in gesonderten Darstellungen als Funktion der Zeit nach ^3H -TdR-Injektion aufgetragen. Für jede Markierungsschwelle (MS) wurde damit eine eigene FLM-Kurve konstruiert (Abb. 15), aus der dann jeweils die Zellzyklusparameter ermittelt wurden (Verfahren wie in I. 4.4. und I. 5. angegeben). Die Werte von t_S , $t_{M \max}$ und $t_{G_2 \min}$ wurden anschließend, geordnet nach steigender Markierungsschwelle, in einer Übersicht zusammengefaßt (Abb. 16). Weiter wurden für die MS 3, 5, 8 und 15 SK die ersten FLM-Maxima gesondert gezeichnet und in eine einzige Darstellung eingetragen (Abb. 17).

2.4. FLM-Kurven für verschiedene Markierungsschwellen m t Berücksichtigung der Lage der Mitosen im Leberlobulus (Topik)

In jedem einzelnen der 10 Unterabschnitte des Leberlobulus wurden mit gleicher Silberkornzahl markierte Mitosen addiert und daraus für die Markierungsschwellen (MS) 3, 5, 8 und 15 SK jeweils die Fraktion markierter Mitosen (FLM) berechnet. Mit einer für jede Zone und darin noch je nach MS gesonderten Auftragung der FLM-Werte als Funktion der Zeit nach Injektion des DNA-Vorläufers ergeben sich für die 4 Markierungsschwellen je 10 FLM-Kurven, die den Unterabschnitten des Acinus zugeordnet sind (Verfahren siehe I. 4.) (Abb. 18 - Abb. 21). Die aus den FLM-Kurven gemessenen Zellzyklusparameter t_S , $t_{G_2 \text{ min}}$ und $t_{M \text{ max}}$ wurden anschließend, entsprechend ihrer Lokalisation im Leberlobulus, für die Markierungsschwellen 3, 5, 8 und 15 SK in je einer Graphik zusammengefaßt (Abb. 22 - Abb. 25). Dann wurden die für die 4 Markierungsschwellen bestimmten und entsprechend ihrer Lokalisation im Lobulus eingetragenen Werte von t_S , bzw. $t_{G_2 \text{ min}}$ und $t_{M \text{ max}}$ in einer für jede Zyklusphase eigenen Darstellung aufgeführt (Abb. 26 - Abb. 28).

2.5. FLM-Kurven für Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen in Teilbereichen des Leberlobulus für 3 SK als Markierungsschwelle

In den benachbarten Lobulus-Unterabschnitten 2 und 3, 5 und 6, bzw. 8 und 9 wurden jeweils gleiche Mitosestadien zusammengefaßt und als Einheit gewertet. Als markiert galten Zellen mit 3 oder mehr Silberkörnern über den Chromosomen (MS = 3 SK). Für jeden Bereich und gesondert für jede einzelne Mitose-Teilphase wurden dann die Frak-

tion markierter Mitosen (FLM) berechnet und die Werte als Funktion der Zeit nach $^3\text{H-TdR}$ -Injektion angetragen (analog wie in III. 2.2.2. für $\text{MS} = 8 \text{ SK}$). Daraus ergaben sich für die 3 ausgewählten Teilbereiche des Acinus jeweils eigene FLM-Kurven von Pro-, Meta-, Ana- und Telo-phasen (Abb. 29). In 2 + 3, 5 + 6, bzw. 8 + 9 wurden dann bei $\frac{n_M^+}{n_M} = 0,5$ zwischen den ansteigenden Kurvenschenkeln der FLM-Maxima der einzelnen Mitosestadien die zeitlichen Abstände gemessen (gleiches Verfahren wie in III. 2.2.1.).

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung der Größe des Backgrounds in der Autoradiographie

3.1.1. Silberkorndichten und Verlauf der Kurve

In den ausgewerteten histologischen Schnitten befinden sich auf einer quadratischen Fläche von $42,6 \mu\text{m}$ Kantenlänge durchschnittlich 3,76 Hepatocytenkerne. Die mittlere Fläche eines Kerns beträgt rund $56 \mu\text{m}^2$.

Der Background zeigt 0,5 Std. nach $^3\text{H-TdR}$ -Injektion mit 10 - 13 Silberkörnern pro $1000 \mu\text{m}^2$ seine höchste Silberkorndichte. Bis zur 1. Stunde nach der Applikation sind die Werte bereits um mehr als die Hälfte auf etwa 4 SK/1000 μm^2 gefallen. Dann nehmen sie bis zum nächsten Messpunkt nur noch minimal ab und nach 1,5 Std. ist keine weitere allgemeine Verminderung der Silberkorndichten mehr erkennbar. Bis zur 50. Std. nach Vorläufer-Injektion zeigen sich dann nur noch regellose Schwankungen der Einzelwerte um eine Mittellage von ca. 3,6 SK/1000 μm^2 . Ein erneuter, signifikanter Anstieg oder Abfall ist nicht sichtbar (Abb. 14).

Auf ein der mittleren Kernfläche der Hepatocyten entsprechendes Gebiet fallen ab der 1. Std. nach $^3\text{H-TdR}$ -Injek-

tion durchschnittlich 0,2 Silberkörner des autoradiographischen Backgrounds. Bei 0,5 Std. (nach Injektion) findet man auf dieser Fläche noch rund 0,67 Silberkörner.

3.1.2. Besprechung

Weil bei der FLM-Methode die exakte Abgrenzung zwischen markierten und unmarkierten Mitosen von entscheidender Bedeutung ist, sollte das Ausmaß falsch positiver Markierung durch Nulleffekt bzw. Artefakte genau bekannt sein. Da es unmöglich ist, Autoradiographien zu erhalten, die völlig ohne Background sind (Pelc 1957, Schultze 1968), und man im Autoradiogramm sogar fälschliche SK-Markierung von Zellen bei Tieren findet, die gar kein ^3H -TdR erhalten haben (Bryant 1962, Post et al. 1963), wird es nötig, den Background quantitativ zu bestimmen, um die Silberkornczahlen bzw. Zählungen markierter Zellen entsprechend zu korrigieren (Pelc 1957, Bryant 1962, Sawicki et al. 1971). Man kann auch versuchen, ihn niedrig zu halten und die Ursachen einer Steigerung der Silberkorndichte (Quastler and Sherman 1959, Grisham 1962, Schultze 1968) zu vermeiden. Analog dazu werden Autoradiogramme nach niedrigem Background ausgewählt (Quastler and Sherman 1959, Stocker und Heine 1965 b, Stocker und Pfeifer 1967, Fabrikant 1967 d, Fabrikant 1968, u.a.). Eine geringere Filmempfindlichkeit, wie die der hier verwendeten Emulsion K 2 (Ilford) (Oehlert und Buchner 1961), kann die größeren Fehler eines höheren Nulleffekts bereits verringern.

Diese hier über den gleichen Parenchymbereichen wie die Auszählung markierter Mitosen vorgenommene Bestimmung der Silberkorndichte des Backgrounds (jeweils für jeden Zeitpunkt nach ^3H -TdR-Injektion) ist notwendig, da der autoradiographische Background sogar schon ohne ^3H -TdR-

Applikation über dem Gewebe signifikant höher sein kann als über gewebefreien Arealen (Tonna and Cronkite 1956, Sawicki et al. 1971).

Zur Feststellung der mittleren SKD des Background wurden jeweils die Kernflächen von der Silberkornzählung ausgenommen, denn die mögliche SK-Markierung der Kerne nach durchblaufreier α -Phase und Inkorporation von ^3H -TdR läßt eine alleinige Wertung der Background-bedingten Silberkerner nicht mehr zu. Deswegen wird hier nur indirekt aus der mittleren SKD in der Umgebung auf die durchschnittliche, Background-bedingte Silberkornzahl auf der Kernfläche selbst geschlossen.

Der durchschnittliche Background aller ausgewerteten Präparate liegt mit $5000 \pm 500 \text{ pr}^2$ verhältnismäßig sehr niedrig. Die bei 0,5 Std. nach ^3H -TdR-Applikation demgegenüber erheblich gesteigerten und auch noch bei 1,0 Std. angedeutet erhöhten SK-Werte erklären sich aus der in diesem Zeitraum nach Injektion noch höheren, im Kreislauf und Gewebe befindliche, ungebundenen ^3H -Aktivität. Obgleich die Clearance aus dem Blut für ^3H -TdR wie für ^3H -Aktivität sehr hoch ist (Rubini et al. 1960, Chang and Looney 1965) und im Gewebe auch der Abbau zu Tritium und anderen Kataboliten sehr rasch erfolgt (Chang and Looney 1965), steht ^3H -TdR noch in fallender Konzentration insgesamt zwischen 40 - 60 Minuten zur Verfügung (Hughes et al. 1958, Rubini et al. 1960, Koburg und Maurer 1962, Wegener et al. 1964, Chang and Looney 1965). Das führt zur vorübergehenden Markierung sichverteilender Strukturen, nicht nur der DNA-synthetisierenden Zellen. Man konnte dazu feststellen, daß 15 Minuten nach Injektion des markierten Vorläufers praktisch alle Zellen markiert sind; nach 30 Minuten ist diese Markierung schon viel schwächer, aber noch deutlich über dem erst später erkennbaren, eigentlichen Nulleffekt (Feld and Appleton 1965). Diese Tatsache erklärt auch die bei 0,5 Std. hier sehr

hohe, mit steigender Versuchszeit aber rasch abnehmende SKD des Backgrounds im Autoradiogramm. Nach 1 Stunde liegt rund die Hälfte des verabreichten ^3H -TdR als tritiiertes Wasser, die andere Hälfte in die DNA eingebaut oder in Form von Stoffwechselprodukten vor (Rubini et al. 1960, Steel and Lamerton 1965). Der Anteil freier ^3H -Aktivitäten konnte noch länger zu hohem Background und damit fälschlicher SK-Markierung über Kernen und Cytoplasma führen. Um Störungen durch diese flüchtige Radioaktivität wie ^3H -Wasser, markierte Vorläufer, Metabolite, etc. weitgehend auszuschalten, muß sie möglichst beseitigt werden; durch wiederholtes "Auswaschen" unter Zusatz von inaktivem Vorläufer im Überschuss zum Fixationsmittel und anderen Lösungen ist sie entfernbar (Steel and Lamerton 1965, Schultze 1968). Wie aus dem anfangs steilen Absinken der SKD des Background (Abb. 14) zu folgern ist, erreicht aber die hier vorgenommene Spülung der Schnitte mit inaktivem Thymidin, zumindest bei kurzen Versuchszeiten, noch kein vollständiges Herauslösen der nicht DNA-gebundenen ^3H -Aktivitäten.

Dieses Vorgehen bewirkt jedoch zum Teil, daß ab 1,5 Std. bis zum Ende des Versuchszeitraums eine weitere signifikante Änderung, d.h. vor allem Abnahme des Background, fehlt. Damit wird gleichzeitig auch ein möglicher kleiner, über die normale Verfügbarkeitszeit hinaus bestehender, sich langsam verringernder Pool von ^3H -TdR oder Derivaten, wie er etwa bei L-Zellen (Cleaver and Holford 1965) gefunden wurde, weitgehend für die hier untersuchten Hepatocyten ausgeschlossen.

3.2. FLM-Kurven und Zellzyklusparameter für verschiedene Markierungsschwellen (MS = 1, 2, 3, 4, 5, 6 bzw. 15 SK) ohne Berücksichtigung der Lage der Mitosen im Leberlobulus ("Summenkurven")

3.2.1. Ergebnisse

3.2.1.1. FLM-Kurven (Abb. 15)

Auf die zu Beginn der Versuchszeit (bei 0,5 Std.) in den FLM-Kurven für 1, 2 und 3 SK als Markierungsschwelle auftretende größere Zahl markierter Mitosen folgt bis zur ersten Stunde nach $^3\text{H-TdR}$ ein rascher Abfall auf etwa ein Drittel des jeweiligen Wertes. Die hier wie bereits vom Anfang an mit steigender Markierungsschwelle jeweils weniger weit von der Abszisse entfernten FLM-Kurven gehen dann 1 - 2 Std. später in den aufsteigenden Schenkel des 1. Maximums über. Auch für eine MS von 4 SK sind bei 0,5 Std. noch 1 - 2 von 1000 Mitosen (in FLM-Kurve nicht mehr erkennbar) markiert. Erst ab 5 SK fallen alle Punkte zwischen 0 und 2 Stunden mit der Abszisse zusammen.

Der Anstieg der einzelnen FLM-Kurven zum 1. Maximum erfolgt mit höherer Markierungsschwelle zunehmend später, die Steigung ändert sich dabei wenig. Mit höheren Markierungsschwellen werden die FLM-Gipfel deutlich niedriger, immer mehr abgerundet und die Maxima insgesamt schmaler. Der absteigende Schenkel tritt bei einer MS von 15 SK zuerst auf; in kurzen zeitlichen Abständen folgen nacheinander die Kurven für 8, 5, 4, 3, 2 und 1 SK. Im weiteren Verlauf fällt für die MS 1 SK die Anzahl markierter Mitosen unmittelbar nach dem 1. Maximum nur wenig; bis 50 Std. bleibt die flach wellenförmige Kurve dann (mit rund $2/3$ markierten Mitosen) auf etwa gleicher Höhe. Ein 2. FLM-Gipfel wird nicht erkennbar; nur um 35 Std. nach $^3\text{H-TdR}$ -Applikation zeigt sich eine leichte Einsenkung. Diese hat sich bei einer MS von 2 SK verstärkt und

ein 2. FLM-Maximum ist eben angedeutet. Der für die MS 2 SK gegenüber 1 SK erheblich tiefer gelegene Mittelabschnitt der FLM-Kurve fällt zwischen 1. und 2. Gipfel insgesamt leicht ab. Bei 3, 4, 5 und 8 SK kommt der Kurvenverlauf in diesem Abschnitt der Abszisse immer näher, bis bei 15 SK hier keine Mitosen mehr als markiert gewertet werden. Das etwa ab 3 SK deutlich ausgeprägte 2. FLM-Maximum verliert mit weiter steigender Markierungsschwelle rasch an Höhe; absolut etwa doppelt so viel wie gleichzeitig das 1. Maximum. Vor dem 2. Gipfel findet sich bei den FLM-Kurven für 8 und 15 SK als Markierungsschwelle eine flache, wellenförmige Erhebung. Mit steigender MS endet das 2. FLM-Maximum zunehmend früher vor dem Ende des Versuchszeitraums durch ein Absinken der FLM-Kurve auf Null.

3.2.1.2. Zellzyklusphasen (Abb. 16)

In der FLM-Kurve für die Markierungsschwelle 1 SK wird t_S mit rund 9,5 Std. bestimmt (nachdem die Messung bei $\frac{n_M^+}{n_M} = 0,5$ erst nach kurzer geradliniger Verlängerung des absteigenden FLM-Kurvenschenkels möglich war). Mit weiter steigender Markierungsschwelle nimmt der t_S -Wert dann kontinuierlich bis auf 6,6 Std. bei 15 SK ab.

$t_{G_2 \min}$ steigt zwischen den FLM-Kurven für die Markierungsschwellen 1 und 2 SK relativ schnell von 2,70 auf 2,96 Std. an. Dann nimmt diese Zeitspanne bis zu 3,08 Std. für die MS 8 SK nur noch sehr langsam zu und wird erst bei der FLM-Kurve für die MS 15 SK mit 3,28 Std. merklich länger.

Für $t_{M \max}$ werden aus der FLM-Kurve für die MS 1 SK 2,43 Std. gemessen. Bei einer MS von 2 SK ist dieser Wert mit 2,18 Std. deutlich geringer; er bleibt dann in den FLM-

Kurven bis zur MS 8 SK nahezu gleich. Für die Markierungsschwelle 15 SK ist $t_{M \max}$ mit 2,24 Std. nur noch unwesentlich höher.

Die bei den FLM-Kurven für die Markierungsschwellen 3 bis 15 SK gemessenen Zellzykluszeiten (t_C) liegen alle etwa um 33 Stunden (Tab. 3). Auch für 2 SK ergibt sich (bei Messung von t_C zwischen dem Beginn der ansteigenden Schenkel von 1. und 2. FLM-Maximum) nahezu der gleiche Wert. Der FLM-Kurvenverlauf für die Markierungsschwelle 1 SK läßt keine Bestimmung von t_C mehr zu.

Aus dem allgemein in den FLM-Kurven für die Markierungsschwellen 2 bis 15 SK etwa gleich langen t_C von 33 Std. ergeben sich (nach Subtraktion von t_S , t_{G_2} und t_M) die Zeiten von G_1 .

So wird t_{G_1} für eine MS von 2 SK zu 18,9 Std. berechnet und steigt mit Erhöhung der Schwelle über 19,4 Std., 19,7 Std., 19,9 Std. und 20,1 Std. bis auf 20,9 Std. für 15 SK an (Tab. 3).

3.2.1.5. 1. FLM-Maxima für die Markierungsschwellen 3, 5, 8 und 15 SK

Die in einer gemeinsamen Darstellung (Abb. 17) zusammengefaßten 1. FLM-Maxima (für MS = 3, 5, 8 und 15 SK) lassen deutlich eine Minderung von Höhe, Breite und Fläche mit steigender Markierungsschwelle erkennen. Die FLM-Kurve mit der niedrigsten MS hüllt jeweils alle anderen mit höherer MS vollständig ein. Die Zeitabstände zwischen den einzelnen ansteigenden FLM-Kurvenschenkeln für die Markierungsschwellen 3, 5 und 8 SK sind gering, bis zur Kurve für eine MS von 15 SK etwas größer. Um ein Mehrfaches länger sind dagegen die entsprechenden Zeitintervalle zwischen den jeweiligen absteigenden Kurvenschenkeln. So ist die deutliche Verlängerung von t_S mit fal-

lender Markierungsschwelle vor allem durch eine Verbreiterung des gemessenen Intervalls, d.h. Zeit-Zunahme, im Endabschnitt des FLM-Maximums bedingt.

3.2.2. Besprechung

Ein Wechsel der Markierungsschwelle, ab der Mitosen als markiert gewertet werden, bewirkt schrittweise Veränderungen des FLM-Kurvenverlaufs. Damit zeigt sich hier *in vivo* bei Ratten-Hepatocyten ein prinzipiell gleiches, bereits *in vitro* an Sarkomzellen (Shackney et al. 1973), Fibroblasten (Moore 1971) oder bei *in vivo* - *in vitro* Untersuchungen an Leukämie-Zellen (Harriss and Hoelzer 1971) festgestelltes Verhalten.

In den FLM-Kurven für die Markierungsschwellen 3, 2 und 1 SK ergibt sich vor dem eigentlichen Anstieg zum 1. FLM-Maximum, d.h. zwischen 0 und 2,5 Std. Versuchszeit, eine je nach MS unterschiedliche Anzahl markiert gewerteter Mitosen; bei den höheren Markierungsschwellen fallen die FLM-Werte dort ganz auf Null (Abb. 15). Diese also relativ schwache Markierung der Zellen ist mit größter Wahrscheinlichkeit nicht durch direkten Einbau des applizierten ^3H -TdR in die DNA entstanden. Dafür ist sowohl die Silberkornbelegung zu gering, wie auch die Zeitspanne für Markierung einer Zelle in der S-Phase, Durchlaufen von G_2 und Eintreten in die Mitose, zumindest für die meisten Fälle, zu kurz. Auch kann die geringe SK-Markierung als Folge der Reutilisation markierter DNA-Katabolite (Bryant 1962) hier noch nicht von nennenswerter Bedeutung sein; mit deren Einsetzen ist im allgemeinen erst wesentlich längere Zeit nach Vorläufer-Injektion (d.h. nach 12 bis 24 Std.) zu rechnen (Diderholm et al. 1962, Bryant 1962, Feinendegen et al. 1963, Bryant 1965, Heininger et al. 1971, Helpap et al. 1971). Die schwache SK-Markierung

dieser Mitosen bei 0,5 Std. kann deswegen in erster Linie nur vom autoradiographischen Background verursacht sein. Das wird weiter ersichtlich durch die ("falsch" positive) Markierung von knapp $1/5$ aller Mitosen in der FLM-Kurve für die MS 1 SK (zwischen 1 und 5 Std. Versuchszeit), wo als Folge des Background rund 0,2 SK pro Kern zu liegen kommen (siehe IV. 5.1.1.). Da 2 oder 3 SK noch wesentlich seltener auf dieser Fläche gleichzeitig anzutreffen sind, sollten für diese Markierungsschwellen dort auch die als markiert gewerteten Mitosen entsprechend abnehmen, was in den zugehörigen FLM-Kurven (Abb. 15) auch sichtbar wird. Die bei 0,5 Std. gegenüber später jeweils erheblich größere Zahl positiv gewerteter Mitosen erklärt sich aus dem zu diesem Zeitpunkt noch wesentlich erhöhten Background (siehe Abb. 14). Den dort durchschnittlich 0,67 SK/Kernfläche entspricht in den FLM-Kurven für die Markierungsschwellen 1, 2 und 3 SK jeweils eine etwa 2 - 3-fach höhere Zahl markierter Mitosen als bei den späteren Versuchszeitpunkten mit ihrem etwa gleichen Background von 0,2 SK/Kernfläche. Während der Verfügbarkeitszeit von ^3H -TdR ist also vorübergehend die Silberkorndichte über den Zellen bzw. die Zahl der "falsch positiv" markierten Zellen erhöht.

Die Markierung der DNA mit ^3H -TdR führt im Autoradiogramm nicht zu einer über allen Kernen immer gleichen SKD; es ergibt sich dagegen eine bestimmte Häufigkeitsverteilung der jeweiligen Silberkornzahlen mit einem Gipfel bei einer mittleren SKZ und Abfall der Kurve zu den höchsten und niedrigsten Werten (Koburg 1963). Zusätzlich ändert sich diese mittlere SKZ auch noch je nach Versuchszeitpunkt im Verlauf der FLM-Kurve (Stöcker und Pfeifer 1967, Harris and Hoelzer 1971). Bei einer Erhöhung der Markierungsschwelle steigt somit in Abhängigkeit von Häufigkeitsverteilung und mittlerer SKD die Zahl der dann als negativ gewerteten, zu schwach markierten Mitosen. Für jeden ein-

zelnen Versuchszeitpunkt wird damit das Verhältnis markierter zur Gesamtzahl der ausgezählten Mitosen jeweils unterschiedlich verkleinert; die daraus berechneten FLM-Kurvenpunkte müssen entsprechend zunehmend niedriger liegen. So entsteht mit steigender Markierungsschwelle (siehe Abb. 15) die schrittweise Verschmälerung der FLM-Maxima, verbunden mit verminderter Höhe der Gipfelplateaus und Verlagerung der ansteigenden Schenkel zu späteren, der absteigenden Kurvenschenkel zu früheren Zeiten.

Als notwendige Folge der zeitlichen Versetzung des Kurvenanstiegs wird stufenweise ein deutlich verlängertes $t_{G_2 \text{ min}}$ aus den FLM-Kurven abgelesen (Abb. 16).

Diese Änderung ist zwischen den Markierungsschwellen 1 SK und 2 SK wohl deswegen relativ groß, weil die FLM-Kurve bei der MS 1 SK auch schon vor Beginn des 1. Maximums weit über der Abszisse verläuft; die Festlegung des t_{G_2} -Wertes war also schwierig und erst durch geradlinige Verlängerung des Kurvenanstiegs bis zur Abszisse behelfsmäßig möglich. Davon ist auch die Messung von $t_{M \text{ max}}$ beeinflusst und dieser aus der FLM-Kurve der MS 1 SK abgelesene Wert wohl deshalb vergleichsweise etwas zu lang. Da aber in den FLM-Kurven für die Markierungsschwellen von 2 bis 15 SK dann die $t_{M \text{ max}}$ -Werte nahezu gleich bleiben ist anzunehmen, daß die aus FLM-Kurven bestimmten Mitosedauern nur gering von unterschiedlichen Markierungsschwellen beeinflusst werden. Dementsprechend sind die zur Messung verwendeten ansteigenden FLM-Kurvenschenkel hier auch nur jeweils parallel gegeneinander versetzt (siehe Abb. 15 und Abb. 17).

Die DNA-Synthesezeit (t_S), sonst ein selbst bei verschiedenen Zellarten und unterschiedlichen Proliferationsbedingungen eher gering variabler Wert (Young 1962, Stöcker und Pfeifer 1967, Heine und Stöcker 1970), und auch bei gleichen Auswertungsbedingungen in verschiedenen Bereichen des Leberacinus konstant (siehe Absatz II.), wird durch

Steigerung der Markierungsschwelle gleich um mehrere Stunden verändert (Abb. 16). Ähnlich starke Zeitveränderungen des t_S -Abschnitts beim Wechsel der MS werden aus den FLM-Kurven von Shackney et al. (1973) sichtbar. Auch Moore (1971) beschreibt bei einer Schwelle von 20 SK gegenüber 10 SK um Stunden verkürzte S-Phasen.

Der unmittelbare Vergleich am 1. FLM-Maximum für die Markierungsschwellen 3, 5, 8 und 15 SK (Abb. 17) zeigt deutlich, daß die schrittweise Verkürzung von t_S zum größten Teil am abfallenden Kurvenschenkel erfolgt. Das gleiche ist auch in den FLM-Kurven von Shackney et al. (1973) erkennbar. Zeitlich entspricht dieser Bereich dem Anfang der DNA-Synthesephase der später bei 0 Std., d.h. Tötung, als markierte Mitosen gewerteten Zellen. Als eine Hauptursache der dort deutlicheren t_S -Verkürzung ist die nicht absolut punktförmige radioaktive Markierung der Zellkerne anzusehen, da ^3H -TdR immerhin etwa 40 - 60 Minuten zum Einbau in die DNA zur Verfügung steht (Hughes et al. 1958, Rubini et al. 1960, Koburg und Maurer 1962, Wegener et al. 1964, Chang and Looney 1965). Die effektive Dauer der Pulsmarkierung (erkennbar an der Zunahme der SK7/Zelle) kann sogar 2 Stunden erreichen (Shackney et al. 1973). Durch Injektion von radioaktivem Vorläufer werden deshalb alle Zellen markiert, die sich gerade in S befinden, und zusätzlich noch solche, die während der Verfügbarkeitszeit erst in die DNA-Synthesephase einlaufen (Wimber 1963). Diese geringe Verlängerung von t_S um die Markierungszeit kann im allgemeinen vernachlässigt werden (Lala 1971); hier erklären sich daraus jedoch die erheblichen t_S -Differenzen zwischen FLM-Kurven verschiedener Markierungsschwellen.

Eine maximale SK-Markierung durch ^3H -TdR wird erreicht, wenn die Verfügbarkeitszeit gänzlich von der S-Phase überdeckt ist. Bei ^3H -TdR-Applikation kurze Zeit vor Beginn der S-Phase bestimmter Zellen, bleibt diese Deckung un-

vollständig und der mehr oder weniger lange Anfangsabschnitt der Verfügbarkeitszeit ist schon vor DNA-Synthesebeginn abgelaufen. Entsprechend geringer ist deswegen die nun noch zum Einbau in DNA vorhandene ^3H -TdR-Menge, da deren Konzentration während der Verfügbarkeitszeit rasch abnimmt (Rubini et al. 1960, Chang and Looney 1965, Lang et al. 1968). Gleichzeitig wird auch die prozentuale Beteiligung von exogenem ^3H -TdR an der gesamten DNA-Synthese geringer (Lang et al. 1966, Lang et al. 1968).

Wegen des bei solchen Zellen also geringeren Einbaus von radioaktivem Vorläufer in die DNA fällt dann auch die SK-Markierung (SKD) über dem Kern. Sie wird umso geringer, je länger die ^3H -TdR-Injektion vor dem Beginn ihrer S-Phase erfolgte, weil dann bis zum Beginn von S die Konzentration des noch utilisierbaren ^3H -TdR schon stark abgenommen hat. Wenn nun auch sehr schwach markierte Mitosen als positiv gewertet werden, erhält man als t_S -Wert eine bis um die gesamte Verfügbarkeitszeit verlängerte DNA-Synthesephase. Bei Wahl einer höheren MS erscheinen nur noch solche Mitosen als markiert, bei denen der vorausgehende Einbau von ^3H -TdR entsprechend stark war. Das geschieht, wenn sich S-Phase und Verfügbarkeitszeit während eines längeren Zeitraums überschneiden. Deswegen wird die dann noch mögliche Zeitspanne von Injektion bis zum DNA-Synthesebeginn wesentlich kürzer sein, bei der noch eine ausreichend starke ^3H -Markierung erreicht wird und die beim FLM-Verfahren (zusätzlich zur eigentlichen S-Phase) in die t_S -Messung einbezogen ist. Die erhebliche Reduzierung von t_S bei höheren Markierungsschwellen (Abb. 17) macht dies deutlich.

Dagegen bleibt die Verkürzung von t_S mit höherer MS am Anstieg zum FLM-Maximum, d.h. zeitlich am Ende der S-Phase der ausgewerteten Mitosen, vergleichsweise gering. Da der Hauptteil des exogenen ^3H -TdR in den ersten 10 - 20 Minuten nach Applikation in die DNA eingebaut wird (Quastler

and Sherman 1959, Rubini et al. 1960, Lang et al. 1968), ist schon nach sehr kurzer Aufnahmezeit eine relativ hohe SK-Markierung des Kerns erreicht (z.B. Wegener et al. 1964). Folglich werden auch bei nicht völliger, sondern nur teilweiser Deckung von DNA-Synthesephase und den ersten Minuten der Verfügbarkeitszeit die Mitosen nur wenig schwächer markiert. Die einzelnen FLM-Werte sind deshalb (bei erhöhter MS) nur unwesentlich kleiner (Abb. 17). Erst bei sehr hohen Markierungsschwellen, wie etwa 15 SK, macht sich dann doch die etwas schwächere Markierung der erst kurz vor Ende der DNA-Synthesephase markierten Zellen als t_S -Verkürzung deutlicher bemerkbar.

Die Gesamtveränderungen des t_S -Intervalls bei Erhöhung der MS sind so erheblich (besonders durch Verschiebungen des absteigenden FLM-Kurvenschenkels), daß neben den Auswirkungen der relativ langen Verfügbarkeitszeit mit dabei fallender Konzentration von $^3\text{H-TdR}$ noch weitere auslösende Ursachen zu erwägen sind.

Jede jeweils einen der Kurvenpunkte des FLM-Maximums ergebende Mitosegruppe kann als zur gleichen Zeit markierte, weitgehend synchron die S-Phase und G_2 durchlaufende und bei 0 Std. in der Mitose befindliche Zellpopulation angesehen werden. Die dabei den absteigenden FLM-Kurvenschkel darstellenden markierten Mitosen befinden sich zeitlich am Beginn, die am Gipfel und ansteigenden Schenkel entsprechend in der Mitte bzw. am Ende der DNA-Synthesephase. Die Markierung der Zellen (bzw. mittlere SKZ und Häufigkeitsverteilung) nach $^3\text{H-TdR}$ -Injektion ist ein Maß, bzw. hängt ab von der Höhe der DNA-Syntheserate (Koburg und Maurer 1962, Koburg 1963, Wegener et al. 1964, Schultze 1968) zum gerade getroffenen Abschnitt der S-Phase. Dabei sind die Angaben zum Verhalten der DNA-Synthese während der S-Phase teilweise recht gegensätzlich. Es wird jedoch auch als verfrüht angesehen, einen bei allen Zellarten gleichen DNA-Syntheseablauf anzunehmen (Dörmer et

al. 1970). Aussagen über die DNA-Syntheserate wie z.B. nach SK-Zählungen über Mitosefiguren (z.B. Stanners and Till 1960), sind hier auf etwa ähnliche Art aus der bei Erhöhung der Markierungsschwelle unterschiedlich starken Reduzierung (vgl. Abb. 15 und Abb. 17) der einzelnen FLM-Werte möglich. Sie ist bei Zellen, die zu Beginn ihrer DNA-Synthesephase markiert wurden (hier in den FLM-Kurven dem absteigenden Schenkel entsprechend), erheblich deutlicher als bei solchen, die erst kurz vor Ende der S-Phase ^3H -TdR einbauen konnten. Wäre bei den hier untersuchten Hepatocyten die DNA-Syntheserate konstant und am Anfang und Ende von S relativ scharf abgegrenzt, wie u.a. bei Fibroblasten (Killander and Zetterberg 1965, Zetterberg and Killander 1965), verschiedenen Zellarten von Ratte und Maus (Pilgrim und Maurer 1965) und Kryptenepithelien (Koburg 1963), näherungsweise auch bei Erythroblasten (Dörmer et al. 1970), könnte man damit die zwischen dem Anfang und Ende von S stark veränderte Zahl schwach markierter Zellen nicht erklären. Selbst bei Berücksichtigung der hier am S-Phasen-Beginn zahlreichen schwächer markierten Zellen aufgrund der nicht absoluten Punktmarkierung (siehe oben) dürfte bei höheren Markierungsschwellen die Abnahme positiv gewerteter Mitosen am Anfang von S nicht so erheblich stärker als an deren Ende sein. Daß die Syntheserate im Verlauf von S nicht konstant sein muß, zeigen u.a. Untersuchungen an Normoblasten (Alpen and Johnston 1967) mit einer deutlich niedrigeren Syntheserate am Anfang und im Endabschnitt von S. Eine Steigerung auf ein Synthese-Maximum spät in S fanden Sordat et al. (1972), einen Gipfel in Phasenmitte Schaer et al. (1971). Für Einzelzellen der regenerierenden Rattenleber deutet sich an, daß auch dort die DNA-Syntheserate während der S-Phase variieren kann (Looney 1960). Aus den hier vorliegenden Ergebnissen spricht die besonders große Zahl schwächer markierter Mitosen zu Beginn

von S für eine entsprechend anfangs niedrige, später erhöhte DNA-Syntheserate. Ein ähnlicher wie der somit für die beobachteten Hepatocyten zu vermutende Verlauf mit leichtem Syntheseanstieg von Anfang bis Ende scheint auch bei fetalen Zellen der Ratte vorzuliegen (Wegener et al. 1964). HeLa-Zellen zeigen ebenfalls einen etwa linearen Anstieg in den ersten 5 Stunden der Synthesephase bei einem in der Mitte von S mehr als doppelt so schnellen DNA-Kettenwachstum (entlang der Replicons) als zu Beginn (Painter and Schaefer 1971). Ein solcher Wechsel der DNA-Syntheserate war an der regenerierenden Rattenleber sogar auf mehreren Ebenen nachzuweisen (Looney et al. 1967): Sowohl bei der Einzelzelle, beim Einzelchromosom wie im molekularen Bereich werden nach allmählichem Anstieg, bedingt durch die zunehmende Zahl von Replicationsorten, die Höchstwerte jeweils erst kurz vor Ende der Synthesephase erreicht. Bezogen ist dies immer auf eine "Summen"-S-Phase, da sich diese bei einer größeren Zelle noch aus vielen verschiedenen S-Phasen für die einzelnen Replicationsorte zusammensetzt (Prescott 1968).

In der FLM-Kurve für die MS 1 SK (und zum Teil auch für 2 SK) werden im Bereich zwischen dem 1. und 2. FLM-Maximum noch so viele Mitosen als markiert gewertet, daß die FLM-Kurve nach dem ersten Gipfel nur vergleichsweise gering absinkt, bis zum Ende der Versuchszeit hoch über der Abszisse verläuft und ein zweiter Gipfel nicht klar zu erkennen ist. Die ähnliche Auswertung einer FLM-Kurve bei Harris und Hoelzer (1971) zeigt ebenfalls bei niedriger Markierungsschwelle (>4 SK) nur ein minimales Absinken der FLM-Werte vor einem 2. Anstieg, wogegen letzterer dann bei höherer MS (>19 SK) durch ein tiefes Tal vom vorausgehenden Gipfel getrennt ist. Hier bedeutet die bei steigender Markierungsschwelle rasche Annäherung der FLM-Kurve an die Abszisse, daß im Mittelabschnitt vor allem schwächer markierte Mitosen auftreten. Somit stellen

diese Zellen, im Gegensatz zu den mehrfach stärker markierten Zellen vom 1. oder 2. Gipfel, aber auch k_{ein} echtes, nur eben abgeflachtes FLM-Maximum dar; auch Stöcker und Pfeifer (1967) finden im Anschluß an das 1. FLM-Maximum solch einen hohen Prozentsatz schwach markierter Mitosen, die nicht als ein neuer FLM-Peak anzusehen sind. Zudem hätten sie dann auch eine sehr kurze, bei der normalen Leber kaum zu erwartende G_1 -Phase von nur einigen Stunden. Das wäre weit weniger als die eigentlich anzunehmende Mindestdauer der praeproliferativen Synthesen von ca. 15 Std. (Rabes und Tuczek 1971). Die wenigen stärker markierten und damit noch bei höherer MS positiv gewerteten Mitosen in diesem Mittelteil der FLM-Kurve dürften in erster Linie Zellen mit erheblich von denen der übrigen abweichenden Zellzyklusphasen sein.

Als eine andere Ursache dieser vielen schwach markierten Zellen scheidet der autoradiographische Background wohl weitest aus, da mit ihm allein weder deren Zahl noch SKD zu erklären ist. Das Ausmaß allein durch Background hervorgerufener falsch positiv markierter Mitosen ist, wie der abzissennahe FLM-Kurvenverlauf vor dem 1. Maximum zeigt, mehrfach geringer als die Menge der z.B. im Mittelabschnitt der FLM-Kurve für die MS 1 SK markierten Mitosen. Ein Ansteigen des Background mit längeren Versuchszeiten, was eine dort verstärkte fälschliche SK-Markierung bewirken könnte, ist bis zur 50. Std. nicht vorhanden (vgl. Abb. 14).

Ein Teil der zahlreichen schwach markierten Zellen zwischen dem 1. und 2. Peak könnte auch durch einen kleinen, über die normale Verfügbarkeitszeit hinaus bestehenden ^3H -TdR-Pool hervorgerufen sein. Zur Existenz eines solchen Pools sind bei bestimmten Zellsystemen Hinweise gegeben (Literatur bei Schultze 1968). Aber selbst wenn hier in unserem Zellsystem ein solcher vorhanden gewesen wäre, könnte er

mengenmäßig kaum von Bedeutung sein; denn dazu müßten eigentlich bei kurzen radioaktiven Versuchszeiten (d.h. vor dem 1. FLM-Gipfel) zumindest etwa gleich viel Mitosen wie später nach dem 1. Gipfel als markiert gewertet sein. Auch ein langsames Absinken des autoradiographischen Background, das die allmähliche Verkleinerung dieses Pools anzeigt, ist nicht sichtbar (Abb. 14).

Einige dieser schwach markierten Hepatocyten sind vielleicht auch durch Inkorporation kleiner ^3H -TdR-Mengen (in die DNA) entstanden, ohne daß sich die Zelle dabei in der S-Phase, bzw. Zellteilung befand. Bei einer Reihe von Geweben konnte man einen dementsprechenden geringen, langsamen DNA-Umsatz bzw. eine metabolische DNA-Synthese nachweisen (Viola-Magni 1966, Pelc and Viola-Magni 1969, u.a.). Ob auch an der regenerierenden Leber eine solche instabile DNA von Bedeutung ist, kann hier nicht entschieden werden.

Für den größten Teil dieser schwächer markierten Mitosen im Mittelabschnitt der FLM-Kurve dürfte die vielfach nachgewiesene Reutilisation radioaktiv markierter DNA-Metaboliten (Diderholm et al. 1962, Bryant 1962, Bryant 1965 a, Bryant 1965 b, Fichtelius and Groth 1963, Stone et al. 1965, Steel and Lamerton 1965, Bryant 1965, Feinendegen et al. 1966, u.a.) verantwortlich sein.

Wenn Zellen nach einer im Versuchszeitraum zwischen dem 1. und 2. FLM-Gipfel erfolgten Vorläufer-Injektion ^3H -TdR in ihrer S-Phase einbauen, können sie, von Ausnahmen mit stark abweichenden Zellzyklusphasen abgesehen, zeitlich kaum bei Tötung, d.h. zum Beobachtungszeitpunkt in der Mitose sein. Bei solchen dennoch zum Zeitpunkt 0 Std. markiert erscheinenden Mitosen, wo ^3H -TdR in der Versuchszeit zwischen 1. und 2. Peak appliziert wurde, konnte ^3H -TdR zum Zeitpunkt der Injektion sicher nicht direkt zur SK-Markierung führen, da sich hier diese Zellen gar nicht in der S-Phase befanden. Der verabreichte radioaktive Vorläu-

fer wurde zuerst in die DNA anderer synthetisierender Zellen aufgenommen; später, bei deren Absterben, werden markierte DNA-Bruchstücke freigesetzt und in einer dem Beobachtungszeitpunkt (0 Std.) vorausgehenden DNA-Synthesephase in proliferierende Hepatocyten eingebaut. Diese indirekte Markierung durch Reutilisation führt zu der schwachen SK-Belegung der dann bei 0 Std. ausgewerteten Mitosen, im Gegensatz zu einer hohen SKD, wie sie bei direkter Markierung einer DNA-synthetisierenden Zelle auftritt (vgl. Bryant 1962). Vermutlich stammen diese wiederverwendeten markierten DNA-Metabolite aus Geweben mit hoher Proliferationsrate und häufigem Untergang markierter Zellen (Robinson and Brecher 1963). Da bei der Leber nach Teilhepatektomie in der ersten Zeit (bis 36 Std.) nur sehr wenige Parenchymzellnekrosen erwartet werden können (vgl. Stöcker und Pfeifer 1967), sind zugrundegegangene markierte Leberzellkerne selbst vermutlich nur zu einem sehr geringen Teil Lieferant radioaktiver DNA-Metaboliten. Als Quelle für die Reutilisation viel bedeutungsvoller ist besonders markierte Leukocyten-DNA; so fand Bryant (1962), daß 5 - 10% der gesamten DNA-Thyminbasen der regenerierenden Leber von reutilisierten Leukocyten-DNA-Basen beigetragen werden. Nach Infusion radioaktiv markierter Lymphocyten bestätigt die Markierung proliferierender Leberzellen diesen wichtigen Reutilisationsmechanismus (Bryant 1962, Bryant 1963 b). In größerem Umfang kommen noch abgestorbene markierte Zellen des Darmepithels (vgl. Heininger et al. 1971), des hämatopoetischen Systems (Steel and Lamerton 1965) und des lymphatischen Gewebes (Bryant 1965) als Lieferant radioaktiver DNA-Kataboliten in Frage. Im einzelnen lassen sich dabei mehrere verschiedene Reutilisationsmechanismen unterscheiden (siehe Steel and Lamerton 1965). Da die SK-Markierung nach Reutilisation markierter DNA-Bruchstücke allgemein relativ schwach bleibt (Bryant 1962, Helpap et

al. 1971), bekräftigt dies noch zusätzlich diesen Entstehungsmechanismus für einen großen Teil der schwächer markierten Mitosen aus dem Mittelabschnitt der FLM-Kurve zwischen 1. und 2. Maximum.

Im Gegensatz zu den zwar erst einige Zeit nach Injektion auftretenden (Diderholm et al. 1962, Bryant 1962, Bryant 1965), dann aber zunehmend zahlreicheren durch Reutilisation markierten Zellen (Heininger et al. 1971, Helpap et al. 1971), bleibt hier eine solche Steigerung, erkenntlich an der sich ab 16 Std. Versuchszeit kaum noch ändernden Zahl schwächer markierter Mitosen, aus. In einem ähnlichen Versuch (Stöcker und Pfeifer 1967) werden diese schwächer markierten Zellen sogar nach einiger Zeit seltener, was mit einem kleinen, über die eigentliche normale Verfügbarkeitszeit hinausreichenden und allmählich abnehmenden ^3H -TdR-Pool erklärt wird. Die schwache SK-Markierung sollte dabei durch Utilisation noch nicht eingebauten Vorläufers entstehen. Für das Bestehen eines solchen Pools fehlt hier aber näherer Anhalt. So ist die in den FLM-Kurven (Abb. 15) fehlende weitere Zunahme schwächer markierter Mitosen wohl als methodisch bedingt anzusehen.

Die unmittelbar vor dem Anstieg zum 2. FLM-Gipfel als Vorwelle erscheinenden, also etwas stärker als im übrigen Mittelabschnitt markierten Mitosen könnten ebenfalls durch Wiederverwendung von DNA-Bruchstücken entstanden sein; mit zunehmender Versuchszeit steigt nämlich auch die SKD über durch Reutilisation markierten Zellen an (Heininger et al. 1971). (Sonstige mögliche Ursachen dieser Vorwelle siehe Absatz II.).

Schon unmittelbar im Anschluß an das 1. FLM-Maximum (bei 14 - 16 Std.) liegt die FLM-Kurve bei niedrigen Markierungsschwellen weit höher als bei alleiniger Markierung durch Background-Effekte (entsprechend dem FLM-Kurvenverlauf kurz vor dem 1. Gipfel) zu erwarten wäre. Damit

hat hier offensichtlich schon relativ früh nach ^3H -TdR-Injektion die Reutilisation markierter DNA-Bruchstücke durch die Hepatocyten eingesetzt. In den Kryptenepithelien werden vergleichsweise erst 18 - 20 Std. nach der Transfusion markierter Lymphocyten radioaktiv markierte DNA-Vorläufer erhältlich (Bryant 1965 b).

Es wird erwartet, daß die Reutilisation auf der Ebene von niedermolekularen Metaboliten wie Nucleotiden oder Nucleosiden abläuft, wobei aber auch der erneute Einbau von DNA-Polynucleotiden nicht ganz auszuschließen ist (Hill and Drasil 1960, Bryant 1963 b).

Während für die Markierungsschwellen 1 SK und auch 2 SK der 2. FLM-Gipfel nicht oder nur angedeutet erkennbar ist, beweist dessen deutliches Hervortreten erst bei den höheren Markierungsschwellen, daß es sich hier tatsächlich um ein echtes 2. FLM-Maximum mit gegenüber dem Kurven-Mittelabschnitt stark markierten Mitosen handelt. Die dabei im Vergleich zum 1. Gipfel allgemein geringere Höhe ist (vgl. Absatz I.) aus der Versuchsanordnung und dem besonderen Proliferationsablauf nach Hepatektomie zu erklären. Weiter nehmen Höhe und auch Breite des gesamten 2. FLM-Maximums mit steigender MS sehr rasch ab. Die schrittweise Verminderung der einzelnen FLM-Werte ist dabei wesentlich stärker als beim 1. FLM-Gipfel; überschlagsweise etwa doppelt so stark. (Das gilt sowohl für den Schritt von einer Markierungsschwelle zur nächsthöheren wie auch zwischen den MS 1 SK und 15 SK). Folglich ist anzunehmen, daß die Zahl schwächer markierter Zellen nach längerer Versuchszeit, wie im Bereich des 2. FLM-Gipfels, etwa zweimal so hoch liegt wie zu deren Anfang beim 1. Gipfel. Eine vergleichbare Halbierung der SK-Zahl (Oehlert und Buchner 1961, Post and Hoffman 1964, Post and Hoffman 1965 a, Post and Hoffman 1967, Schultze and Maurer 1972) mit entsprechender Vermehrung schwächer markierter Zellen erfolgt bei der Zellteilung. Damit be-

stätigt sich indirekt, daß die bereits längere Zeit vor der Tötung markierten Zellen des 2. FLM-Maximums zum Beobachtungszeitpunkt 0 Std. schon ihre zweite Zellteilung durchlaufen, wogegen die den 1. FLM-Gipfel bildenden Zellen dort gerade in der ersten Teilung sind.

Bei Bestimmung von t_C ergibt sich für alle Markierungsschwellen annähernd der gleiche Wert, denn die jeweilige Mitte beider FLM-Gipfel als Meßpunkt verändert ihre Lage trotz steigender Markierungsschwelle nur unwesentlich. Da sich jedoch gleichzeitig die beiden Maxima erheblich verschmälern, nehmen die für $t_{G_2 \text{ min}}$ wie für t_{G_1} gemessenen Zeiten schrittweise zu, während t_S , bei etwa gleichbleibendem $t_{M \text{ max}}$, in den FLM-Kurven mit hohen MS stark abnimmt. Eine Erhöhung der Markierungsschwelle bei der FLM-Kurve von Leukämiezellen führt ebenfalls zu einer Verkürzung von S und einer entsprechenden Verlängerung von G_1 und G_2 (Harris and Hoelzer 1971).

Während also die Dauer der meisten Zellzyklusphasen bei Bestimmung mit der FLM-Methode mehr oder weniger stark mit den jeweiligen Auswertungskriterien schwankt, bleibt die Zellzykluszeit (t_C) ein weitgehend fixierter, kaum von der Methodik beeinflusster Parameter.

3.3. FLM-Kurven für verschiedene Markierungsschwellen mit Berücksichtigung der Lage der Mitosen im Leberlobulus (Topik)

3.3.1. Verlauf der FLM-Kurven

3.3.1.1. FLM-Kurven für 5 SK als MS (Abb. 18)

Das erste FLM-Maximum zeigt in portalen Zonen ein breites Gipfelplateau mit bis zu 99 % markierten Mitosen. Zur T.H.V. hin nimmt die Abrundung und Erniedrigung des Gipfels langsam zu. Der ansteigende Kurvenschenkel erscheint von portal nach venös schrittweise später und wird dabei insgesamt flacher. Nur hier in den FLM-Kurven für die MS

3 SK finden sich (mit Ausnahme von Zone 1) schon bei 0,5 Std. nach ^3H -TdR-Injektion etliche markierte Zellen.

In den verschiedenen Zonen bleibt der Mittelabschnitt der FLM-Kurven zwischen den Gipfeln jeweils leicht wellenförmig bei individuell voneinander abweichendem Verlauf und stärker schwankenden Einzelwerten. Insgesamt liegen hier die Kurven portal relativ hoch ($\frac{n_{M^+}}{n_M} \sim 0,25$) über der

Abszisse und kommen ihr erst unmittelbar perivenös ein geringes Stück näher. Die besonders portal breiten 2. FLM-Maxima erreichen nur für die Zonen 10 bis 5 zunehmend später eine gleichzeitig niedriger werdende, deutliche Gipfelhöhe. In 4 und 3 bestehen sehr stark abgeflachte 2. Maxima, die ihren Höchstwert erst knapp vor Ende des Versuchszeitraumes erreichen. In Zone 2 und 1 sind keine 2. FLM-Gipfel mehr vorhanden; es sind hier sogar jeweils weniger Mitosen markiert als im vorausgehenden Mittelabschnitt der FLM-Kurve. Die höchsten 2. Gipfel befinden sich in 7, 8 und 9 mit Werten von $\frac{n_{M^+}}{n_M}$ bis 0,7. Für Zone 10 liegt dieser Quotient erheblich niedriger; er ist etwa gleich dem von Zone 6.

3.3.1.2. 5 SK als MS (Abb. 19)

Der Kurvenverlauf ist allgemein dem für die Markierungsschwelle 3 SK sehr ähnlich; dabei sind die 1. FLM-Maxima insgesamt schmaler, auch portal die Gipfelplateaus nicht ganz so breit und die folgende intermediäre und venöse Abrundung wird deutlicher. Die höchsten 1. Gipfel in 7 und 8 erreichen aber immer noch Werte bis 0,99 für $\frac{n_{M^+}}{n_M}$.

In den Mittelabschnitten der FLM-Kurven, die meist weitgehend parallel zur Abszisse verlaufen, schwanken die Kurvenpunkte um ein Mittel von etwa 0,1; nur perivenös liegen hier die Kurven noch etwas niedriger und zeigen leicht wellenförmige Gestalt. Die höchsten 2. FLM-Gipfel

liegen wiederum in Zone 7, 8 und 9 mit Werten bis 0,6. Zone 10 bleibt dagegen erneut deutlich zurück. In Zone 3 ist ein 2. Maximum nur noch eben angedeutet und in 2 und 1 nicht mehr vorhanden. Von portalen zu venösen Unterabschnitten verschieben sich diese 2. Gipfel ein wenig näher ans Ende des Versuchszeitraumes. Vor dem 2. FLM-Anstieg ist noch, besonders in Zone 10, eine kleine Vorwelle erkennbar.

3.3.1.3. 8 SK als MS (Abb. 20)

Bei weitgehend gleichartigem Kurvenverlauf wie für die Markierungsschwellen 3 SK und 5 SK haben Höhe und Breite beim 1. FLM-Maximum nochmals gering, beim 2. Maximum dagegen deutlich weiter abgenommen. Als sichtbarste Veränderung kommen die Mittelabschnitte zwischen den beiden FLM-Gipfeln jetzt in den Zonen 3 bis 10 der Abszisse schon sehr nahe. In 1 und 2 fallen sie sogar mit ihr zusammen. (Die Kurven sind identisch mit den bereits in Absatz II. besprochenen; sie sind hier zum unmittelbaren Vergleich mit den FLM-Kurven für andere MS nochmals aufgeführt).

3.3.1.4. 15 SK als MS (Abb. 21)

Der jeweilige Zeitraum bis zum Auftreten der ersten markierten Mitosen ist in den FLM-Kurven der einzelnen Zonen gegenüber den niedrigeren Markierungsschwellen weiter vergrößert; außerdem ist der Anstieg zum 1. FLM-Maximum häufig etwas flacher. Gegenüber der MS 8 SK sind beide Maxima noch schmaler geworden; die Gipfelhöhen haben sogar sprunghaft abgenommen. Die 1. FLM-Gipfel erreichen auch portal im Mittel nur noch Höchstwerte von 0,9 für $\frac{n_M^+}{n_M}$, venös nehmen sie dann deutlich ab. 2. FLM-Maxima sind in Zone 10 bis 5 gut erkennbar vorhanden, in venösen Lobulusbereichen

verschwinden diese Erhebungen rasch. Die höchsten 2. Gipfel erreichen mit maximal 0,35 nur noch etwa die Hälfte des Wertes bei der FLM-Kurve für die MS 3 SK. Im Mittelabschnitt zwischen den Peaks sind in allen Zonen nahezu keine Mitosen mehr markiert; nur portal finden sich hier noch einige als flache Kurven-erhebung unmittelbar vor dem Anstieg zum 2. Gipfel.

3.4.2. Zellzyklusphasen aus FLM-Kurven für die Markierungsschwellen 3, 5, 8 und 15 SK in den 10 Unterabschnitten des Leberlobulus (Abb. 22 - Abb. 25)

Das qualitative zonale Verhalten von t_S , $t_{G_2 \min}$ und $t_{M \max}$ ist jeweils bei allen vier Markierungsschwellen gleichartig: t_S bleibt, von geringen Schwankungen der Einzelwerte abgesehen, zwischen Zone 1 und 10 konstant. $t_{G_2 \min}$ nimmt zwischen Zone 10 und 6 nur sehr gering, aber gleichmäßig zu. Danach steigen die in den einzelnen Unterabschnitten gemessenen Zeiten bis zum Höchstwert in Zone 1 wesentlich schneller an. Für $t_{M \max}$ werden jeweils in den Zonen 7, 8 und 9 die niedrigsten Werte bestimmt. Der Wert von 10 liegt bei allen Markierungsschwellen immer erheblich darüber und ergibt etwa die gleiche Zeitspanne wie für intermediäre Abschnitte. Vom portalen Minimum steigt $t_{M \max}$ dann jeweils bis zur T.H.V. rasch, aber nicht ganz kontinuierlich an.

Diesen bei den FLM-Kurven für die Markierungsschwellen 3, 5, 8 und 15 SK einheitlichen topischen Veränderungen der Zellzyklusparameter stehen wesentliche Unterschiede der absoluten Werte gegenüber: In allen 10 Unterabschnitten des Acinus wird t_S jeweils bei der MS 15 SK am kürzesten bestimmt. Bei den Markierungsschwellen 8, 5 und 3 SK nimmt

dieser Zeitraum dann um einen je nach MS unterschiedlichen, für sämtliche Zonen aber etwa gleichen Betrag an Länge zu. Damit ergeben die jeweils für eine MS in den Lobulusabschnitten 1 bis 10 etwa konstanten t_S -Werte in der graphischen Darstellung vier angenähert parallel zueinander verlaufende Gerade. Diese Linie liegt für MS = 15 SK bei rund 6,6 Std. Darüber befinden sich zwischen 7,6 und 8,2 Std. in geringem Abstand nacheinander die t_S -Verläufe für die Markierungsschwellen 8, 5 und 3 SK (siehe Abb. 26).

Das längste $t_{G_2 \min}$ wird in allen Zonen jeweils in der FLM-Kurve für die MS 15 SK gemessen; für die MS 8 SK über 5 SK bis zu 3 SK werden die Werte dann in allen Zonen des Lobulus gleichermaßen stufenweise geringer. Daneben steigen aber noch die $t_{G_2 \min}$ -Werte für jede einzelne MS von portal nach venös an. Das ergibt vier streng voneinander getrennte, gegeneinander versetzte Kurvenverläufe, die in allen 10 Zonen immer etwa den gleichen Zeitabstand zueinander haben (Abb. 27).

Bei $t_{M \max}$ kommt es bei Änderungen der MS nicht zu regelmäßigen Zu- oder Abnahmen der aus den FLM-Kurven bestimmten Zeiten. In den einzelnen Unterabschnitten des Lobulus wechselt die größenmäßige Reihung der jeweiligen Werte für die Markierungsschwellen 3, 5, 8 und 15 SK regellos. Nur portal wird bei der MS 15 SK $t_{M \max}$ gleichbleibend länger als bei den anderen MS gemessen. Insgesamt aber ergeben die Kurven der $t_{M \max}$ -Werte für die verschiedenen Markierungsschwellen vier sehr nahe beieinanderliegende und sich zwischen Zone 1 und 10 mehrfach wechselseitig überkreuzende Linien (Abb. 28).

t_C wurde hier allein aus dem Zeitabstand zwischen der Mitte des 1. und 2. Maximums der FLM-Kurven ermittelt, da der bei den einzelnen Markierungsschwellen unterschiedlich hohe Mittelabschnitt der FLM-Kurve keine gleichwertige Messung

am Anstieg zum 2. FLM-Maximum erlaubt. Bei einer MS von 3 SK ergeben sich hiermit in den Zonen 9 und 10 mit ca. 34 Std. die kürzesten Zellzykluszeiten. Zur T.H.V. steigen die Werte deutlich an und erreichen in 4 und 3 38,5 Std. bzw. 39,1 Std. t_{G1} wird dabei gleichzeitig von rund 21 auf 24 Stunden erhöht. Bei den Markierungsschwellen 5 SK und 8 SK nimmt t_C von portal nach venös nur mehr gering und zudem nicht ganz gleichmäßig von 33,3 Std. bis auf 35 Std. zu. Die damit für t_{G1} berechneten Zeiten schwanken zwischen etwa 20 und 22 Std., zeigen aber kaum noch eine geregelte zonale Änderung. Für die MS 15 SK ist eine t_C -Zunahme von portal nach venös noch eben angedeutet. Die zugehörigen Werte von t_{G1} ändern sich insgesamt aber nur noch wenig; sie werden zur T.H.V. zu sogar eher etwas kürzer bestimmt. (Tab. 4) In den perivenösen Unterabschnitten kann t_C , und damit t_{G1} , wegen des verschwindenden 2. FLM-Gipfels nicht mehr gemessen werden.

3.3.3. Besprechung

Mit steigender Markierungsschwelle erfolgt durch den Ausschluß schwächer markierter Mitosen eine schrittweise Reduzierung aller FLM-Werte. Das führt in allen Zonen, analog zu den FLM-Kurven für den gesamten Leberlobulus (siehe IV. 2.3.), jeweils zu Verschmälerung und Erniedrigung der beiden FLM-Maxima und einer zunehmenden Annäherung des dazwischenliegenden FLM-Mittelabschnittes an die Abszisse. Obgleich sich dabei mit dem Wechsel der Markierungsschwelle die Lage der einzelnen Kurvenpunkte erheblich verändert, bleibt der prinzipielle Kurvenverlauf für einen Unterabschnitt ohne wesentlichen Wandel. Die charakteristischen zonalen Gestaltsänderungen am ersten Maximum, also am Anstieg, abfallendem Schenkel und Gipfelhöhe, sind für die

einzelnen Markierungsschwellen immer gleichartig erhalten; nur die Absolut-Werte der Zellzyklusphasen werden zum Teil unterschiedlich lang gemessen.

Wie schon bei der FLM-Kurve des gesamten Lobulus (IV. 2.5.) ist auch in allen 10 Zonen beim 1. Maximum die Verminderung von $\frac{n_M^+}{n_M}$ bei Steigerung der MS und die sich daraus ergebende

Links-Verlagerung des Kurvenverlaufs jeweils am abfallenden Schenkel deutlich stärker als am Anstieg. Das bestätigt die schon bei den Kurven für die Gesamtleber festgestellte schwächere SK-Belegung der Mitosen bei Markierung zu Beginn der S-Phase. Als deren Ursache ist vor allem eine die Verfügbarkeitszeit des $^3\text{H-TdR}$ von 40 - 60 Minuten (Koburg und Maurer 1962, Wegener et al. 1964, Chang and Looney 1965, u.a.) erreichende Markierungsphase (siehe IV. 3.2.2.) mit dem entsprechend verlängerten t_S -Abschnitt anzunehmen; aber auch die geringere DNA-Syntheserate zu Beginn von S kann diese anfänglich schwächere Markierung und die dadurch bei hohen Markierungsschwellen hervorgerufene stärkere Verkürzung des gemessenen t_S -Intervalls am absteigenden Schenkel bewirken. Da die mit steigender Markierungsschwelle auftretende Verkürzung des t_S -Intervalls im Bereich des absteigenden Schenkels der FLM-Kurve in allen 10 Unterabschnitten, von geringen, regellosen Schwankungen abgesehen, etwa gleich stark ist, ergeben sich hier keine Hinweise für eine zusätzlich zonal unterschiedliche Verfügbarkeitszeit oder auch DNA-Syntheserate am Anfang der S-Phase.

Die besonders in den FLM-Kurven für die Markierungsschwellen 3 SK und 5 SK sehr hohen und breiten portalen Gipfelplateaus zeigen, daß die Variationen von t_S , t_{G_2} und t_M zusammen Ursache von Abrundung und Höhenverlust (Quastler and Sherman 1959, Stöcker und Pfeifer 1967), dort jeweils nur relativ gering sein können. Die in venösen Zonen dann leicht verstärkte Abrundung und Erniedrigung ist somit

Ausdruck einer entsprechend zunehmenden Variationsbreite der einzelnen Phasenlängen. Die in den FLM-Kurven für die Markierungsschwellen 8 SK und 15 SK auch portal schon deutliche Abrundung und Erniedrigung des 1. Gipfels kann also keine Folge stärkerer Phasenvariationen, sondern nur durch "falsch negative" Wertung, also Ausschluß, schwächer markierter Mitosen bedingt sein.

Die Höhenabnahme des 1. FLM-Gipfels zwischen den Kurven für die Markierungsschwellen 3 SK und 15 SK ist unmittelbar perivenös (in Zone 1) deutlich stärker als im Durchschnitt der übrigen Zonen. Demgegenüber bleibt diese Reduktion in 8 und 9 etwas, in Zone 7 sogar erheblich geringer. Dieser Unterschied könnte Folge eines topisch wechselnden Anteils schwächer markierter Mitosen mit einer entsprechend portal etwas höheren, perivenös niedrigeren SK-Belegung sein. Als Ursache ist eine je nach Lokalisation unterschiedliche Verfügbarkeit, bzw. Konzentration von ^3H -TdR denkbar; dafür bestand aber bisher, aufgrund der Feststellung gleicher mittlerer SK-Dichten bei Zellen aus verschiedenen Bereichen des Acinus, kein Anhalt (Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968). Ein weiterer Hinweis auf möglicherweise doch vorliegende zonale Differenzen der ^3H -TdR-Verfügbarkeit ergibt sich aus den FLM-Kurven für die MS 3 SK. Bei 0,5 Std. werden dort jeweils etliche sicher falsch positiv markierte Mitosen festgestellt, die allein durch den erhöhten Backgroundeffekt der hier kurz nach Injektion, während der Verfügbarkeitszeit, noch verstärkt im Umlauf befindlichen ^3H -Aktivitäten (d.h. ^3H -TdR und Kataboliten) (Rubini et al. 1960, Chang and Looney 1965, Lang et al. 1968) verursacht sind (vgl. IV. 3.1.). Da diese so falsch positiv markierten Mitosen portal in Zone 7 und 8 relativ zahlreich auftreten, dagegen unmittelbar perivenös in 1 aber völlig fehlen, ist hieraus ebenfalls auf eine topisch unterschiedliche ^3H -TdR-Verfügbarkeit mit entsprechend wechselnder SK-Markierung der Zellen zu schließen.

Die für die MS 3 SK (angedeutet auch noch für 5 SK) in den perivenösen Zonen feststellbare zunehmende Annäherung des gesamten Mittelabschnittes der FLM-Kurve an die Abszisse zeigt eine hier allgemein verringerte Zahl schwächer markierter Mitosen. Weil diese markierten Zellen vor allem durch Reutilisation radioaktiver DNA-Bruchstücke entstanden sind (siehe IV. 3.2.), deutet sich damit für die betreffenden Lobulusabschnitte eine leichte Abnahme reutilisierbarer DNA-Kataboliten an. Im Anschluß an das bereits oben Erwähnte wird so eine zonal unterschiedliche Verfügbarkeit von ^3H -TdR und seinen reutilisierbaren Kataboliten wahrscheinlich. Die weiterhin zwischen dem 1. und 2. FLM-Gipfel bei niedrigen Markierungsschwellen in allen Zonen zu beobachtenden stärkeren Schwankungen zwischen den einzelnen FLM-Kurvenpunkten weisen auf größere individuelle Unterschiede zwischen den Einzeltieren bei der Reutilisation von DNA-Kataboliten hin. Die Aufteilung des Lobulus in 10 Zonen läßt durch die entsprechend geringere Zellzahl die Streuungen besonders deutlich hervortreten.

Die in portalen Zonen als kleine Vorwelle vor dem 2. FLM-Gipfel erscheinenden, etwas stärker (als die übrigen Zellen des Mittelabschnittes) markierten Mitosen können ebenfalls vorzugsweise durch Reutilisation entstanden sein; denn mit zunehmender Zeit nach der ursprünglichen ^3H -TdR-Applikation nimmt auch die SKD über durch Reutilisation markierten Zellen zu (Heininger et al. 1971).

Da durch die Zellteilung eine Halbierung der SK-Markierung entsteht (Oehlert und Buchner 1961, Grisham 1962, Post and Hoffman 1964, Schultze and Maurer 1972), müssen von den hier beim 2. FLM-Gipfel ausgewerteten Zellen, die sich bereits einmal geteilt haben, bei Erhöhung der MS erheblich mehr als unmarkiert erscheinen als beim 1. Gipfel. Als dessen deutlich erkennbare Folge werden hier in portalen und intermediären Lobulusbereichen die 2. Maxima jeweils wesentlich stärker vermindert als die 1.; nur

perivenös liegen die 2. Gipfel sogar schon bei der FLM-Kurve für die Markierungsschwelle 3 SK so niedrig, daß dort die Höhenabnahme bei Steigerung der MS nicht mehr viel größer als beim 1. Maximum sein kann.

Die bei den FLM-Kurven für niedrige Markierungsschwellen mit ihren relativ hohen 2. Gipfeln noch gut erkennbare portal-venöse Zunahme des Abstandes zwischen beiden FLM-Maxima ist bei höheren Markierungsschwellen nur noch eben angedeutet, da die 2. Gipfel dort bereits zu stark vermindert und abgeflacht sind. Aber selbst für die MS 3 SK bleibt die absolute Vergrößerung dieses Intervalls, zumindest zwischen portalen und intermediären Zonen, relativ gering. Das bedeutet, daß die schon in Absatz II. bei den FLM-Kurven für die MS 8 SK näher besprochene, insgesamt nur geringe topische Änderung der Zellzykluszeit auch bei Einbeziehung schwächer markierter Mitosen keine wesentlich deutlichere Verlängerung zeigt.

Während bei höheren Markierungsschwellen die FLM-Kurven für die Zonen 1 und 2 im üblichen Zeitbereich des 2. Maximums nahezu bis auf Null gefallen sind, findet man hier bei der MS 3 SK eine etwa gleichbleibende, geringe Zahl markiert gewerteter Mitosen. Eine direkte Markierung dieser Zellen in einer S-Phase zum Zeitpunkt der $^3\text{H-TdR}$ -Applikation war wegen des erst relativ kurzen Zeitabstandes zur Teilhepatektomie und des somit perivenös noch nicht nennenswerten DNA-Syntheseanstiegs (Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970) kaum möglich; die geringe SK-Belegung dieser Hepatocyten muß deshalb vor allem durch Reutilisation entstanden sein. Die Zahl der dann so für die MS 3 SK am Ende des Versuchszeitraums positiv gewerteten Zellen bleibt aber in den vorliegenden FLM-Kurven (Abb. 18) etwas hinter den auf gleiche Weise markierten aus dem Mittelabschnitt der FLM-Kurve zurück. Eigentlich wäre hier später eine noch weiter erhöhte Zahl schwächer markierter Mitosen zu erwarten, da die durch radioaktive

DNA-Kataboliten markierten Zellen mit steigender Zeit nach ^3H -TdR-Applikation zunehmen (Heininger et al. 1971). Ob deren Ausbleiben hier nur methodisch bedingt ist, oder ob längere Zeit nach Injektion sogar ein zunehmender Verlust von ^3H -TdR-Aktivität erfolgt, kann nicht entschieden werden.

Analog zum jeweiligen Verlauf der FLM-Kurven zeigen auch die Zellzyklusparameter t_S , $t_{G_2 \text{ min}}$ und $t_{M \text{ max}}$ für die Markierungsschwellen 3, 5, 8 und 15 SK zwischen P.S. und T.H.V. immer völlig gleichartiges zonales Verhalten. Nur bei den absoluten Zeiten ergeben sich, je nach MS, Unterschiede. Eine schrittweise Erhöhung der MS bewirkt dabei in allen Zonen eine entsprechende Zunahme des Wertes von $t_{G_2 \text{ min}}$ und gleichzeitig eine Verkürzung von t_S . Nur die maximale Mitosedauer ($t_{M \text{ max}}$) wird durch einen Wechsel der MS kaum beeinflusst und bleibt, jeweils für eine bestimmte Zone, ein etwa konstanter Wert. Die systematischen Änderungen von t_S , $t_{G_2 \text{ min}}$ und $t_{M \text{ max}}$ in den FLM-Kurven bei Erhöhung der MS sind damit in jeder einzelnen der 10 Lobulus-Zonen die gleichen wie die für den gesamten Acinus ohne Berücksichtigung der Topik (siehe IV. 3.2.).

Bei t_C ist die geringe Längenzunahme von portal nach venös ebenfalls in den FLM-Kurven aller 4 Markierungsschwellen in gleicher Weise vorhanden, aber nur bei den niedrigeren auch tatsächlich deutlich erkennbar (Abb. 18 und Abb. 19). Für t_{G_1} erhält man deswegen lediglich bei den FLM-Kurven für die MS 3 SK eine mäßige, portal-venöse Zeitänderung. Bei höheren Markierungsschwellen gehen systematische zonale Unterschiede zwischen einzelnen Lobulusabschnitten gänzlich verloren, weil sich allgemein wegen der starken Verminderung des 2. FLM-Gipfels der Abstand zum 1. Gipfel kaum noch sichtbar ändert.

Als Schlußfolgerung ergibt sich daraus, daß eine Änderung der Markierungsschwelle keinen nennenswerten Einfluß auf das prinzipielle, topische Verhalten des FLM-Kurvenverlaufs und der daraus bestimmten Zellzyklusparameter hat. Lediglich bei den Absolutwerten kommt es durch einen Wechsel der Markierungsschwelle zu systematischen, für alle 10 Zonen aber jeweils gleichartigen Veränderungen.

5.4. FLM-Kurven für Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen in Teilbereichen des Leberlobulus für 5 SK als Markierungsschwelle

5.4.1. Verlauf der FLM-Kurven

Die FLM-Werte für die einzelnen Mitosephasen liegen in allen drei Teilbereichen jeweils zu jedem Versuchszeitpunkt (= Injektionszeitpunkt) in nahezu völlig regelmäßiger, geordneter Folge. Die durch sie bestimmten FLM-Kurven sind jeweils für jeden gewerteten Lobulusbereich immer gleichartig und nur mit unterschiedlichem Abstand gegeneinander versetzt. In 8 + 9 und 2 + 3 verlaufen die ansteigenden Schenkel der jeweils vier einzelnen FLM-Kurven weitgehend parallel, in 5 + 6 weichen sie zunehmend etwas auseinander. 0,5 Std. nach ^3H -TdR-Injektion finden sich meist einige markierte Mitosen. Ein deutliches Gipfelplateau bei allen Einzelkurven besteht nur in 8 + 9, in 5 + 6 ist es weit weniger ausgeprägt und bei 2 + 3 völlig abgerundet. Die absteigenden Kurvenschenkel verlaufen in keinem Teilbereich mehr parallel zueinander; um 14 bis 16 Std. Versuchszeit, d.h. nach ^3H -TdR-Applikation verlieren sich allgemein die bis dahin immer noch deutlichen Phasenunterschiede zwischen den aufeinanderfolgenden Mitosestadien. Die bei $\frac{n_M^+}{n_M} = 0,5$ gemessenen Zeitabstände zwischen den nebeneinander gelegenen, ansteigenden FLM-Kurvenschenkeln

betragen in 8 + 9 von Pro- zu Metaphasen 16,0 Minuten, von Meta- zu Ana- 10,4 und von Ana- zu Teleophase 14,7 Minuten; insgesamt 41,1 Minuten. Für jeweils gleiche Intervalle werden in 5 + 6 21,6 bzw. 18,0 und 16,3 Minuten, zusammen 55,9 Minuten gemessen. In 2 + 3 beträgt die Distanz von Pro- zu Metaphase 27,2, von hier zur Anaphase 24,8 und bis zur Telophase 20,8 Minuten. Zwischen Pro- und Telophasen-Kurve liegen 72,8 Minuten.

5.4.2. Besprechung

Die FLM-Kurven der Mitose-Teilstadien für die Markierungsschwelle 5 SK (Abb. 29) zeigen in den Lobulus-Bereichen 8 + 9, 5 + 6 und 2 + 3, verglichen mit den entsprechenden Kurven für die Markierungsschwelle 8 SK (Abb. 50), durch die Einbeziehung auch schwächer markierter Zellen jeweils höhere Gipfel und insgesamt breitere FLM-Maxima aufgrund leichter Linksverlagerung des ansteigenden und erheblich stärkerer Rechtsverschiebung des absteigenden Kurvenschenkels. Die allgemeinen zonalen Verlaufsänderungen der Teilphasen-FLM-Kurven sind für die MS 3 SK denen der Markierungsschwelle 8 SK völlig gleich (vgl. auch III. 5.2.). Die wenigen, hier schon bei 0,5 Std. als markiert gewerteten Mitosen erklären sich wiederum aus dem zu dieser Zeit noch erhöhten Background (siehe IV. 5.1.).

Die individuellen Variationen der Zellzyklusphasen sind zwischen verschiedenen Zellen wie auch Versuchstieren so groß, daß der vergleichsweise sehr kurze zeitliche Abstand zweier aufeinanderfolgender Teilphasen der Mitose mit steigender Versuchszeit schon bald übertroffen wird. Deshalb liegen auch die FLM-Werte aller vier Mitosestadien am ansteigenden Kurvenschenkel noch in zeitgerechter, größenmäßiger Ordnung; mit zunehmender Zeit nach $^3\text{H-TdR}$ -Applikation wird diese Reihung rasch gestört und ist bis

zum Ende des abfallenden Schenkels vollständig verloren gegangen.

Der Zeitabstand zwischen Pro- und Telophasen-FLM-Kurve, verwendbar als Maß für die mittlere Mitosedauer (vgl. III. 4.1.), verdoppelt sich hier bei der MS 3 SK vom Bereich 8 + 9 bis 2 + 3 nahezu. Ebenso sind auch besondere Unterabschnitte der Mitose, festgelegt durch die Distanz der ansteigenden Schenkel von Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen-FLM-Kurve zueinander, für die Markierungsschwelle 3 SK völlig gleichartig von portal nach venös verlängert wie bei einer MS von 8 SK. Neben dem bei beiden MS gleichartigen topischen Verhalten der hier untersuchten Zeitabstände stimmen auch noch jeweils die einander entsprechenden Absolutwerte gut überein.

Zu folgern ist, daß der generelle FLM-Kurvenverlauf für einzelne Mitose-Teilphasen unabhängig von der jeweiligen MS ist und charakteristische zonale Veränderungen immer gleichartig erhalten bleiben. Außerdem bleiben auch die für die mittlere Mitosedauer wie für besondere Unterabschnitte der Mitose gemessenen Zeiten, von der Änderung der Markierungsschwelle fast unbeeinflußt. Diese hier untersuchten Parameter verhalten sich somit identisch wie schon die maximalen Mitosedauern (vgl. IV. 3.2.).

4. Besprechung der Auswertungstechnik

4.1. Wahl der Markierungsschwelle für Mitosen

Um markierte Mitosen-(FLM-)Werte berechnen und die Ergebnisse mit anderen Untersuchungen vergleichen zu können, empfiehlt es sich, der Wahl der Markierungsschwelle, d.h. der SKZ ab der Mitosen als markiert gewertet werden, nähere Beachtung zu schenken.

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, treten bei unter-

schiedlicher weiterer Auswertung jeweils absolut der gleichen markierten Mitosen, je nach der gewählten Markierungsschwelle, zum Teil erheblich differierende Zellzyklusparameter auf. Besonders deutlich wird dies bei den ausgesprochen starken Änderungen der S-Phasenzeit, die sonst eher als ein relativ konstanter Wert anzusehen ist. Auf andere Untersuchungen übertragen bedeutet dies aber, daß selbst eine mehrstündige Zeitdifferenz zwischen zwei aus getrennten Versuchen bestimmten t_S -Werten noch kein absolut sicherer Nachweis einer tatsächlich unterschiedlich langen DNA-Synthesephase sein muß. Um diese sicher zu belegen, ist noch eine weitgehende Übereinstimmung der Auswertungskriterien nötig, was aber **n i c h t** notwendigerweise Festsetzung **g l e i c h e r** Markierungsschwellen bedeutet. Vielmehr ist es nötig, die jeweilige Stärke der SK-Markierung der ausgewerteten Mitosen, bzw. deren mittlere SKD, die von einer Vielzahl kaum in verschiedenen Versuchen völlig konstant zu haltenden Faktoren wie Film, Charge, Verarbeitung, ^3H -TdR-Applikation und -Einbau, Exposition, Entwicklung, β -Selbstabsorption, Schnittdicke, etc. abhängt (Literaturübersicht bei Schultze 1968), der ebenfalls unterschiedlichen Anzahl falsch positiv markierter Zellen gegenüberzustellen. Damit ist eine jeweils **g l e i c h w e r t i g e** Abgrenzung von markiert zu unmarkiert anzustreben. Zu berücksichtigen sind dabei vor allem der Background in der Autoradiographie und die Markierung von Zellen nach Reutilisation radioaktiver DNA-Bruchstücke, ebenso wie verlängert verfügbares ^3H -TdR oder die metabolische DNA-Synthese.

Wählt man beispielsweise eine sehr niedrige Markierungsschwelle (in SK), die aber schon deutlich über der mittleren SK-Dichte des Background pro Kern liegt (wie z.B. in IV. 3.1. bei etwa 0,2 SK/Kern eine MS von 1 SK), muß die damit erstellte FLM-Kurve nicht unbedingt optimal auswertbar sein. Eine erhebliche, die weitere FLM-Kurven-

Auswertung ev. stark störende Anzahl falsch positiv markierter Mitosen kann dennoch, wie hier z.B. vor dem 1. FLM-Maximum sichtbar (Abb. 15), auftreten. Da sich die Verteilungskurven der SK-Dichten von "echt" und "falsch" markierten Mitosen überlappen (Moore 1971), werden bei relativ niedriger MS noch etliche "falsche" zusätzlich als positiv, bei höherer MS entsprechend "echt" markierte als negativ gewertet. Zur Ermittlung einer günstigen Markierungsschwelle hat Tannock (1968, 1969) hierzu eine Häufigkeitsverteilung der SKZ über Mitosen angetragen und diese dann graphisch gegen den autoradiographischen Background abgegrenzt.

Eine geeignete Abgrenzung zwischen markierten und unmarkierten Mitosen kann man wohl ebenfalls treffen, wenn man direkt die Auswirkungen wechselnder Markierungsschwellen auf die FLM-Kurve betrachten kann. So ist beispielsweise von den in IV. 3.2.1. beschriebenen, für verschiedene Markierungsschwellen aufgetragenen FLM-Kurven (Abb. 15) jene als am besten für die weitere Auswertung geeignet anzusehen, wo die allein durch Background-Effekte (FLM-Kurve vor dem 1. Gipfel) oder Reutilisation (besonders Mittelabschnitt der FLM-Kurve) "falsch" positiv markierten Mitosen möglichst noch nicht als markiert gewertet werden und die FLM-Kurven somit (ausgenommen die Gipfel) der Abszisse sehr nahe kommen. Andererseits darf die MS jedoch nicht so hoch liegen, daß die FLM-Maxima insgesamt schon deutlich erniedrigt und verschmälert sind und dann ein sicheres Ablesen der Zellzyklusphasen nicht mehr möglich ist.

Auf diese Weise ließen sich dann auch für verschiedene Versuche mit ihren unterschiedlichen SK-Dichten über den Zellkernen und wechselnden Störeffekten gleiche wertige Abgrenzungskriterien zwischen markiert und unmarkiert finden, wobei die gewählten Markierungsschwellen (in SK) durchaus nicht gleich zu sein brauchten.

4.2. Zur Erstellung der FLM-Kurven

Bedingt durch Variationen der Zellzyklusphasen bei den einzelnen Zellen, individuellen Unterschieden zwischen den Versuchstieren und methodischen Störungen weichen die errechneten FLM-Kurvenpunkte allgemein in wechselndem Ausmaß von dem hypothetischen, geradlinigen Kurvenverlauf (Wimber 1965) ab. Ein einfaches, lineares Verbinden zeitlich aufeinanderfolgender Ergebnispunkte ergibt deswegen eine meist mehrfach gezackte und kaum zu Ablesen der Zellzyklusphasen geeignete Kurve. Das macht es notwendig, eine möglichst glatte, aber dennoch allen einzelnen Punkten gleichermaßen gerecht werdende Kurve zu ziehen; das gelingt aber mit einer nicht näher festgelegten, nur dem subjektiven Augenschein folgenden Kurven-Ziehung kaum befriedigend. Um nun den errechneten Punkten eine gut geglättete FLM-Kurve optimal anzupassen, das Zeichenverfahren zu objektivieren und gut reproduzierbar darzustellen, sind geeignete Regeln zu suchen. Das dürfte hier mit der unter I. 4.4. beschriebenen und für alle Kurven verwendeten Zeichenvorschrift weitgehend erfüllt sein. Ein ähnliches graphisches Annäherungsverfahren wird z.B. bei Hilscher et al. (1972) verwendet, wo bei der mehrmaligen Glättung des Verlaufs jeweils zu einem bestimmten Punkt auch noch die Lage der beiden davor und danach auftretenden Nachbarpunkte mit berücksichtigt wird.

Zur objektivierten und weitgehend optimierten Anpassung an vorgegebene markierte Mitosen-Werte läßt sich auch eine Berechnung des FLM-Kurvenverlaufs mit Computermethoden durchführen (z.B. Barret 1966, Takahashi et al. 1971, Steel and Haines 1971, Gilbert 1972). Bei dieser automatischen Analyse der FLM-Werte können sogar dann noch, zumindest hypothetische, Kurvenverläufe errechnet werden, wenn sich etwa bei sehr stark streuenden Einzelwerten mit der Handzeichnung kaum noch ein bestimmter Verlauf fest-

legen läßt. Andererseits sind die eingegebenen Programme so gehalten, daß Abweichungen vom Zyklusmodell wie z.B. der Verlust markierter Zellen, oder ein zusätzliches Auftreten noch unmarkierter Zellen nicht berücksichtigt werden. Es entstehen so zum Teil erhebliche Diskrepanzen zwischen dem theoretisch berechneten Kurvenverlauf und den tatsächlich vorliegenden FLM-Ergebnispunkten (Steel 1972). Sorgfältig gezeichnete FLM-Kurven müssen also der Computerkurve nicht notwendigerweise in allen Belangen unterlegen sein; zumal bei einer den errechneten Punkten gut angepaßten, handgezeichneten Kurve ein gegenüber der automatischen Analyse nur geringer Objektivitätsverlust entsteht (Gilbert 1972). Schließlich sind zur optimalen FLM-Kurvenbestimmung, mit graphischen wie automatischen Methoden gleichermaßen, eine sorgfältige Mitoseauswertung und möglichst gering streuende FLM-Werte erste Voraussetzung. Der Vorgang einer mathematischen Berechnung allein steigert die Zuverlässigkeit der Daten noch nicht (Steel and Haines 1971).

4.3. Zur Entnahme der Zellzyklusparameter aus der FLM-Kurve

Beim Ablesen der Zellzyklusparameter aus dem FLM-Kurvenverlauf werden insgesamt einfache, jedoch nicht immer einheitliche, weitgehend empirische Regeln angewendet.

Die G_2 -Phase wird meist als $t_{G_2 \text{ min}}$ vom Versuchsbeginn bis zum allerersten Auftreten markierter Mitosen gemessen. (Dieser Zeitabschnitt ist hier als $t_{G_2 \text{ min abs.}}$ bezeichnet).

Genauere Zeitangaben sind damit aber nur möglich, wenn die einzelnen FLM-Kurvenpunkte schon vor Beginn des 1. FLM-Maximums in kurzen zeitlichen Abständen liegen; die Wahl größerer Zeitspannen zwischen aufeinanderfolgenden

Versuchszeitpunkten behindert eine genaue Bestimmung der tatsächlich dem untersuchten Zellsystem zugehörigen G_2 min-Dauer und bei Vergleichen bleiben echte Zeitdifferenzen unerkannt. Dabei stützt sich dieses Verfahren nur auf die Lokalisation eines einzigen FLM-Punktes und kann vor allem Phasenänderungen nur in den vorgegebenen Schritten der aufeinanderfolgenden Injektionszeitpunkte registrieren.

Deswegen wurde hier als Abwandlung des obigen eine bei allen FLM-Kurven zu unmittelbaren, z.B. zonalen, Zeitvergleichen besser geeignete Technik verwendet: Die geradlinige Verlängerung des durch mehrere FLM-Punkte genau bestimmten ansteigenden Kurvenschenkels markiert durch ihren Schnittpunkt mit der Abszisse ein weniger von der individuellen Schwankung eines einzelnen FLM-Werts beeinflusstes Zeitintervall für $t_{G_2 \text{ min}}$. Meist ist dieses etwas länger als das übliche, aus dem ersten Auftreten markierter Mitosen bestimmte $t_{G_2 \text{ min}}$. Beide Meßverfahren ergeben Werte mit innerhalb des Acinus prinzipiell völlig gleichartigem zonalen Verhalten (siehe Abb. 9 in Absatz II.). Nur ist die schrittweise Änderung bei $t_{G_2 \text{ min abs.}}$ wesentlich unregelmäßiger als bei der Messung von $t_{G_2 \text{ min}}$ aus dem Kurvenanstieg. Das letztere Verfahren ist auch dann günstiger als die Bestimmung von G_2 aus nur einem Kurvenpunkt, wenn wie hier z.B. bei höherer SKD des Background oder niedriger Markierungsschwelle die FLM-Kurve schon vor dem ersten Maximum in einiger Entfernung über der Abszisse verläuft (siehe IV. 3.2. und Abb. 13); dort ist ein erstmaliges Auftreten markierter Mitosen zeitlich kaum sicher festzulegen. Diese Schwierigkeiten werden bei einer anderen Auswertungsmethode ebenfalls umgangen, wenn anstatt $G_2 \text{ min}$ ein mittleres G_2 als Zeitraum vom Versuchsbeginn bis zum 0,5-Wert für $\frac{n_{M^+}}{n_M}$ der Prophasen-FLM-Kurve

gemessen wird (Post et al. 1963, Post and Hoffman 1964). Auch ein Intervall $G_2 + \frac{1}{2} M$ von Versuchsbeginn bis zum 0,5-Wert am Anstieg der FLM-Kurve (Wimber 1963, Fabrikant 1967 d, Lindsay-Gibson and Bertalanffy 1972, u.a.) läßt sich bei bereits von Anfang an weiter über der Abszisse gelegenen FLM-Verlauf sowie stark streuenden oder durch längere Zeitabstände getrennten Kurvenpunkten gut ablesen, da nur die Mitte des durch mehrere Punkte festgelegten Kurvenanstiegs betrachtet wird. Mit diesem Verfahren sind aber keine Werte für G_2 allein bestimmbar.

Als Mitosezeit läßt sich aus den hier vorliegenden Kurven am einfachsten ein $t_{M \max}$ (nach Verlängerung des Kurvenanstiegs aus der Zeit zwischen dem Schnittpunkt mit der Abszisse und dem Punkt bei $\frac{n_{M^+}}{n_M} = 1,0$) bestimmen (siehe I. 5.).

Diese Werte sind auch gut geeignet zur Untersuchung der Mitosedauer in den verschiedenen Zonen des Leberlobulus. Weil sich $t_{M \text{ mittel}}$ wie auch kleinere Teilabschnitt der Mitose zonal völlig gleichartig wie $t_{M \max}$ verhalten (siehe II. 4.), bleibt deren wesentlich schwierigere Bestimmung unnötig, solange nicht absolute Zeiten, sondern nur relative topische Änderungen untersucht werden sollen.

Die allgemein übliche Messung von t_S als Zeitintervall zwischen $\frac{n_{M^+}}{n_M} = 0,5$ am ansteigenden und absteigenden FLM-Kurvenschenkel (z.B. Quastler and Sherman 1959, Post et al. 1963, Wimber 1963, Post and Hoffman 1964, Stöcker und Pfeifer 1967, Schultze et al. 1972, Hielscher et al. 1972), läßt sich auch an den hier vorliegenden Kurven gut durchführen, weil die Gestalt der FLM-Maxima durch keine allzu starken Variationen der Zellzyklusphasen verändert wird. Bei erheblichen Variationen von S , G_2 und M ist dagegen dieser Abstand nur noch ein unzuverlässiges Maß für die S-Phasenzeit (Gerecke 1970). Es empfiehlt sich dann, t_S aus der Fläche unter dem FLM-Maximum zu bestimmen.

Mit der Methode, t_C aus dem Zeitabstand korrespondierender Punkte zweier unmittelbar aufeinanderfolgender FLM-Maxima zu berechnen (z.B. Post et al. 1963, Post and Hoffman 1964, Hilscher et al. 1966, Schultze 1968), erhält man hier, je nach Lage der Punkte am Kurvenschenkel, voneinander abweichende Zellzykluszeiten. Um einen mittleren t_C -Wert zu erhalten wurde deshalb (in I. und II.) sowohl zwischen den jeweiligen Mitten des 1. und 2. FLM-Gipfels, wie auch zwischen einander entsprechenden Punkten auf jeweils halber Höhe der ansteigenden Kurvenschenkel beider Maxima und solchen an deren Anstiegsbeginn gemessen. Meist ergeben sich dabei am Beginn der einzelnen Kurvenanstiege die kürzesten Phasenwerte, da durch die Kurvendämpfung schon die 2. Maxima sehr viel flacher, aber in ihrer Basis sogar teilweise breiter werden. t_{G_1} läßt sich dann leicht aus den gemessenen Zellzykluszeiten durch Subtraktion von t_{G_2} , t_S und t_M berechnen (z.B. Schultze 1968, Wegener et al. 1964, Post and Hoffman 1964).

Die automatische Analyse der FLM-Werte durch den Computer hat hierzu als vergleichsweise wichtigsten Vorteil, daß neben den mittleren Phasenzeiten auch gleich die Standardabweichungen angegeben werden können (Takahashi et al. 1971, Steel and Haines 1971, Brockwell et al. 1972, Gilbert 1972, u.a.). Für t_S besteht hier aber die Möglichkeit, die Standardabweichung näherungsweise auch schon graphisch zu bestimmen (Takahashi 1966). Die nach empirischen Methoden graphisch aus dem FLM-Verlauf ermittelten Zellzyklusparameter zeigen sogar oft, zumindest teilweise, gute Übereinstimmung mit den Computerwerten (Steel and Haines 1971); für die einzelnen Meßverfahren bestehen hier aber Unterschiede.

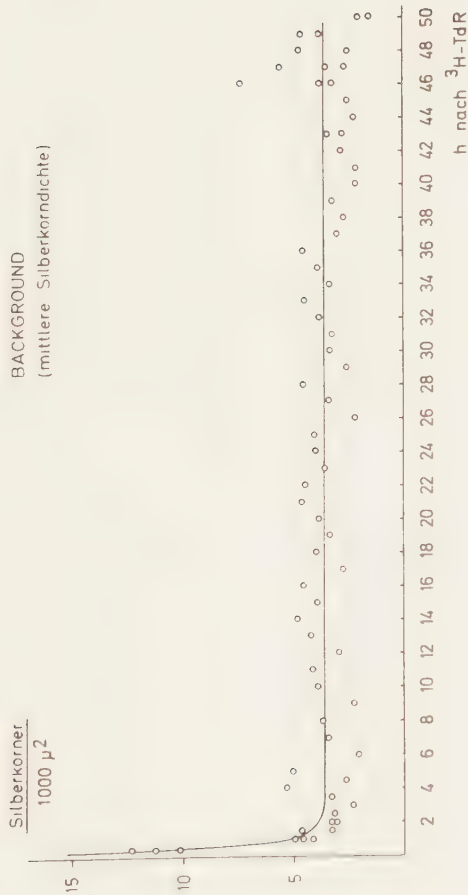


Abb. 14: Mittlere Silberkorndichte des autoradiographischen Background über dem regenerierenden Lebergewebe in Silberkörnern pro 1000 μm^2 (Ordinate) in Abhängigkeit von der Zeit nach Injektion des ^3H -Thymidin (Abszisse). Jeder Kurvenpunkt entspricht einem ausgewerteten Objektträger mit jeweils 3 Einzelschnitten.





Abb. 15: Fraktion markierter Mitosen (FM) (jeweils Ordinaten) als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von 3H -TdR (jeweils Abszissen) zu verschiedenen Zeiten nach Teilhepatektomie (bei Tötung aller Tiere 65 Std. post op.) und verschiedenen Markierungsschwellen (1 - 15 SK) zur Wertung als markierte Mitose. Markierungsschwelle: a) 15 SK, b) 10 SK, c) 5 SK, d) 4 SK, e) 3 SK, f) 2 SK, g) 1 SK. (Für alle 7 FM-Kurven wurden jeweils die gleichen, nach ihrer SKZ differenzierten Mitosen verwendet).

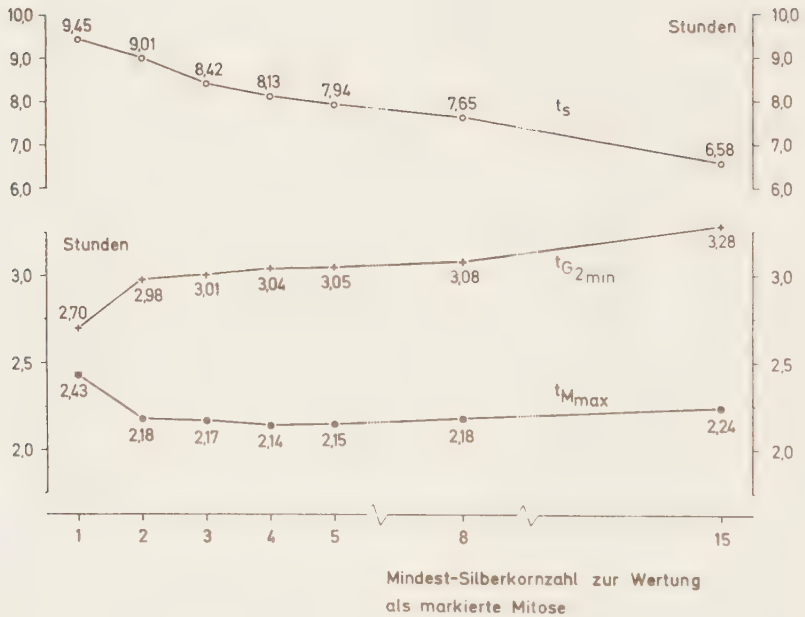


Abb. 16: FLM-Kurven für verschiedene Markierungsschwellen (1 - 15 SK): Die dem jeweiligen FLM-Kurvenverlauf (siehe Abb. 15) entnommenen Zellzyklusparameter t_s , $t_{G_2 \min}$ und $t_{M \max}$ (in Stunden) (Ordinaten) sind in Abhängigkeit von der gewählten Markierungsschwelle (in SK) (Abszisse) aufgetragen.
(Für alle Kurven wurden jeweils die gleichen, nach SKZ differenzierten Mitosen verwendet).



Abb. 17: Fraktion markierter Mitosen (FLM) (Ordinate) als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von ^3H -TdR (Abszisse) für die Markierungsschwellen 3, 5, 8 und 15 SK. (Die sich aus den FLM-Kurven für die 4 Markierungsschwellen ergebenden t_S -Werte sind gesondert hervorgehoben).

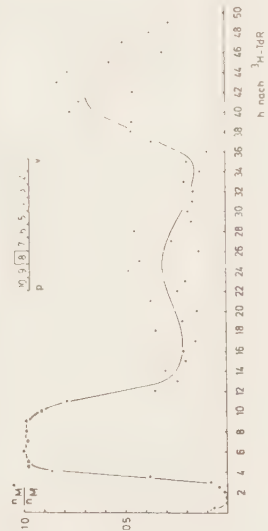
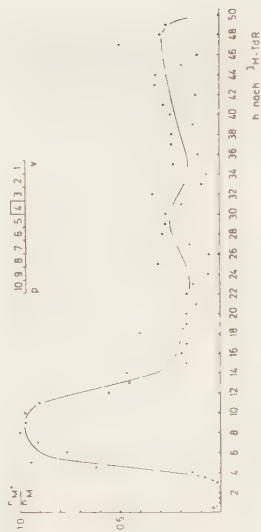
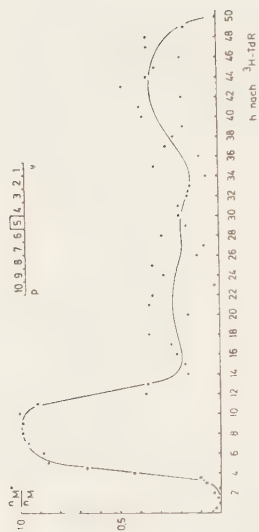
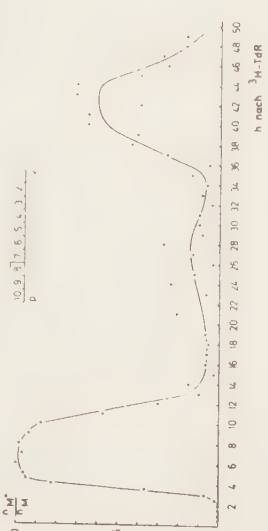
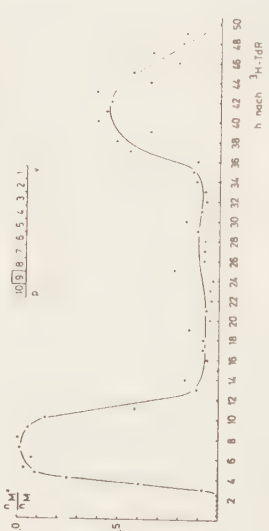
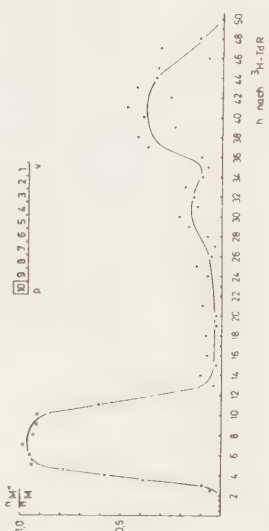
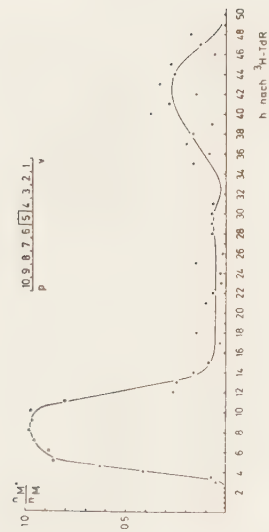




Abb. 18: Fraktion markierter Mitosen (FLM) (Ordinate) als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von 3H -TdR zu verschiedenen Zeitpunkten nach Teilhepatektomie (Abszisse) jeweils für einen der 10 Unterabschnitte des Lobulus. Die rechteckige Umrandung der Nummer der ausgewerteten Zone auf der Strecke P.S. - T.H.V. kennzeichnet die Lokalisation der zugehörigen FLM-Kurve (portale Zonen in der Darstellung links oben, venöse rechts unten).
Markierungsschwelle zur Wertung als markierte Mitose: 3 SK



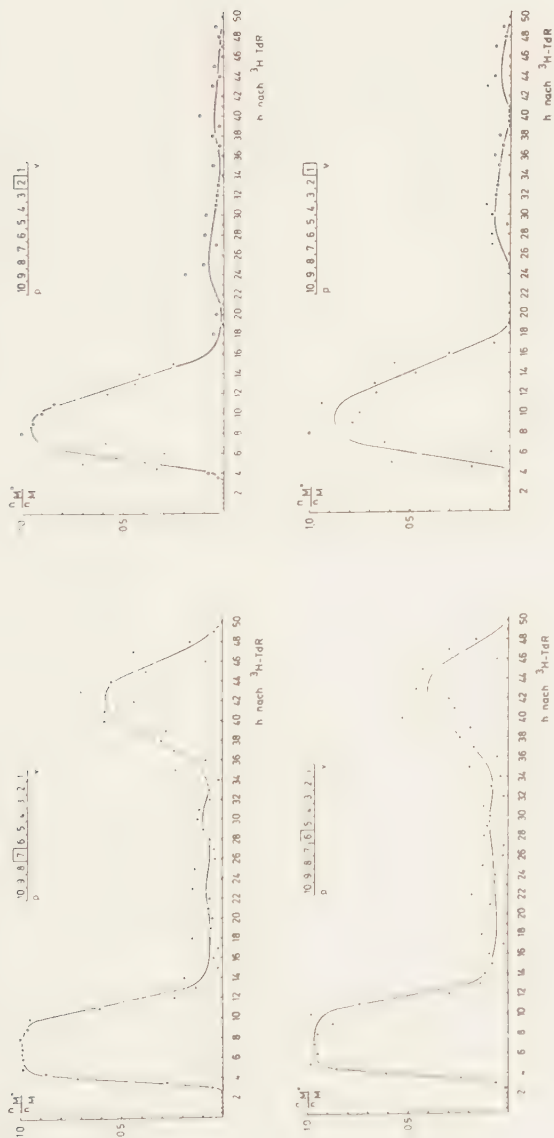


Abb. 19: Markierungsschwelle: 5 SK (sonst wie Abb. 18).

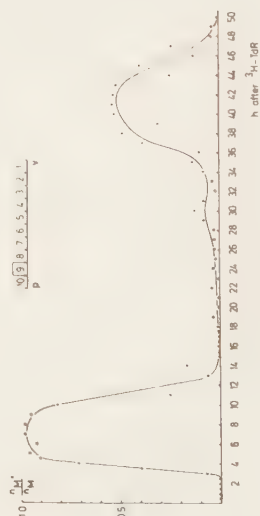
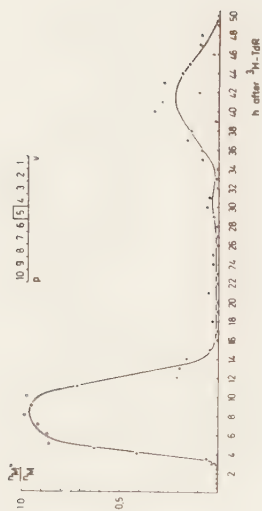




Abb. 20: Markierungsschwellen: 8 SK (sonst wie Abb. 18).

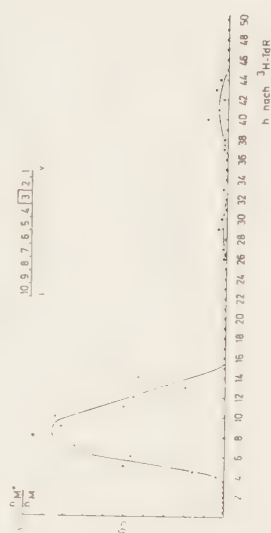
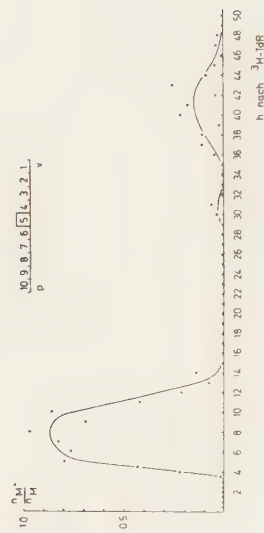




Abb. 21: Markierungsschwelle: 15 SK (sonst wie Abb. 18).

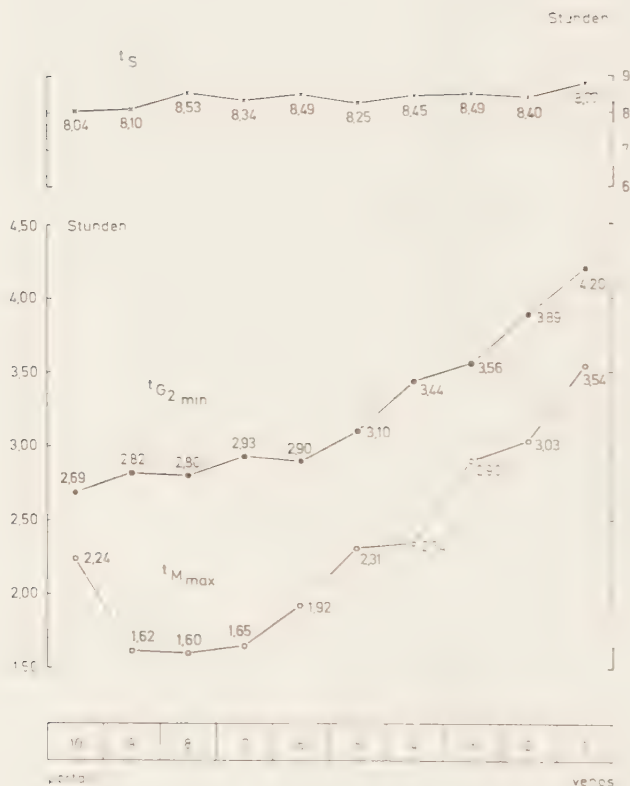


Abb. 22: Aus den FLM-Kurven für die Markierungsschwelle 3 SK entnommene Zellzyklusparameter t_S , $t_{G_2 \min}$ und $t_{M \max}$ (in Std.) (Ordinaten) in Abhängigkeit von der Lokalisation des jeweils ausgewerteten Unterabschnitts im Leberlobulus (Abszisse).

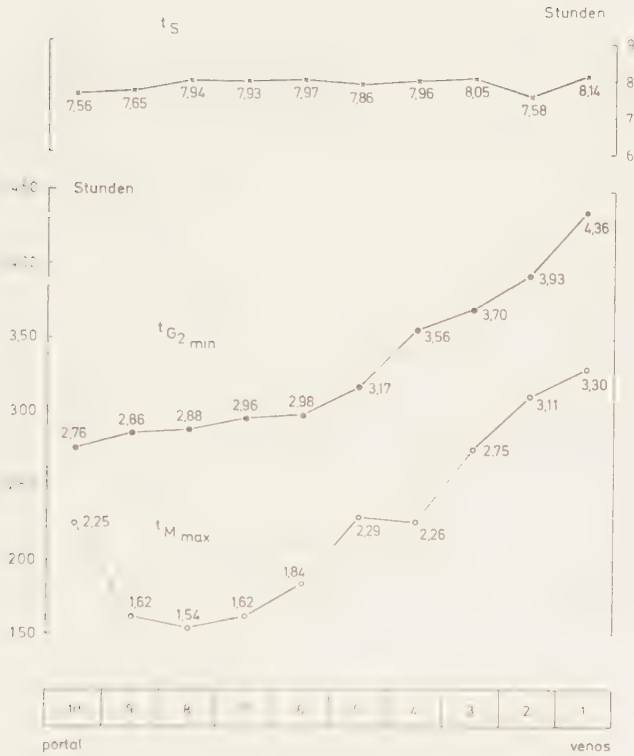


Abb. 25: Zellzyklusparameter bei einer Markierungsschwelle von 5 SK (sonst wie Abb. 22).

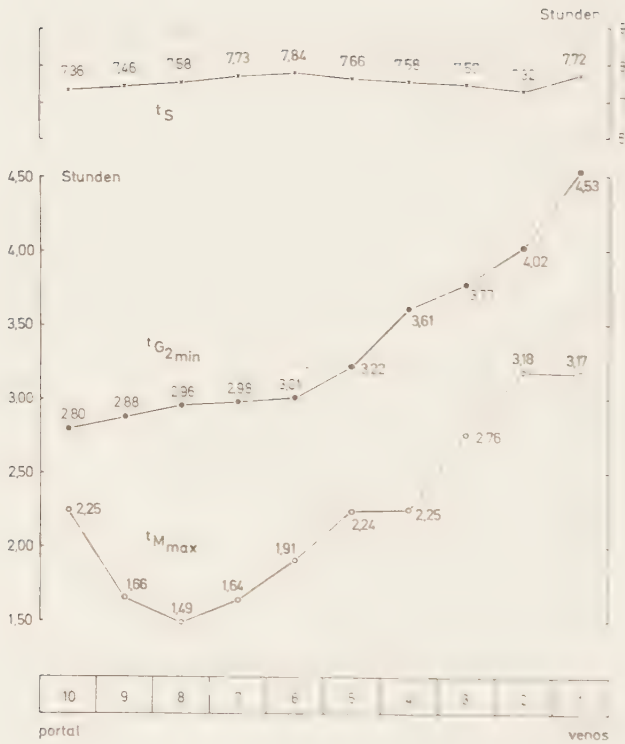


Abb. 24: Zellzyklusparameter bei einer Markierungsschwelle von 6 SK (sonst wie Abb. 22).

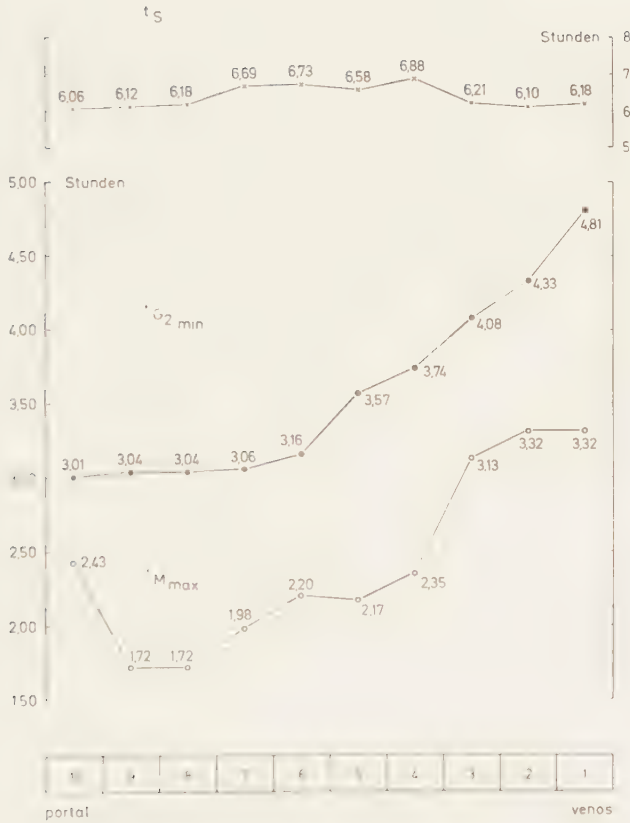


Abb. 25: Zellzyklusparameter bei einer Markierungsschwelle von 15 SK (sonst wie Abb. 22).

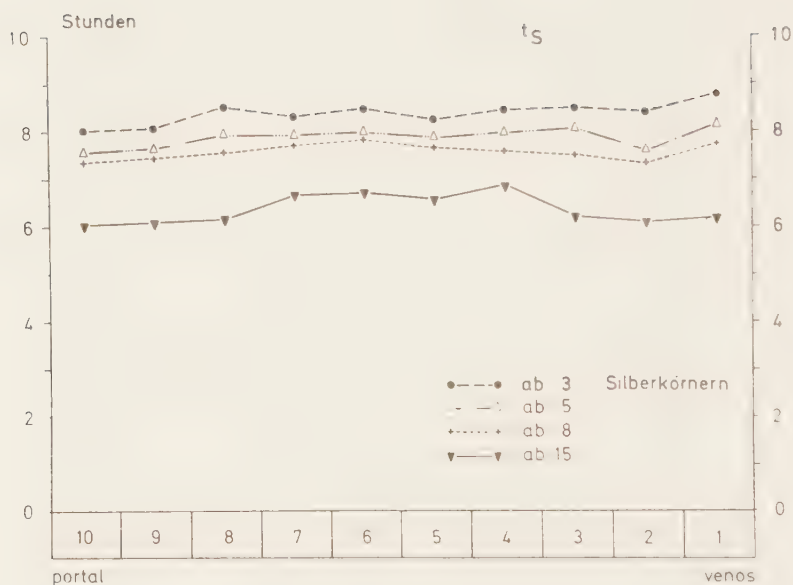


Abb. 26: Den FLM-Kurven für verschiedene Markierungsschwellen entnommene Werte für t_s (Ordinate) in Stunden in Abhängigkeit von der Lokalisation der ausgewerteten Zone im Lobulus (Abszisse).

Markierungsschwellen:

3 SK (●—●), 5 SK (△—△),
8 SK (+—+), und 15 SK (▼—▼).

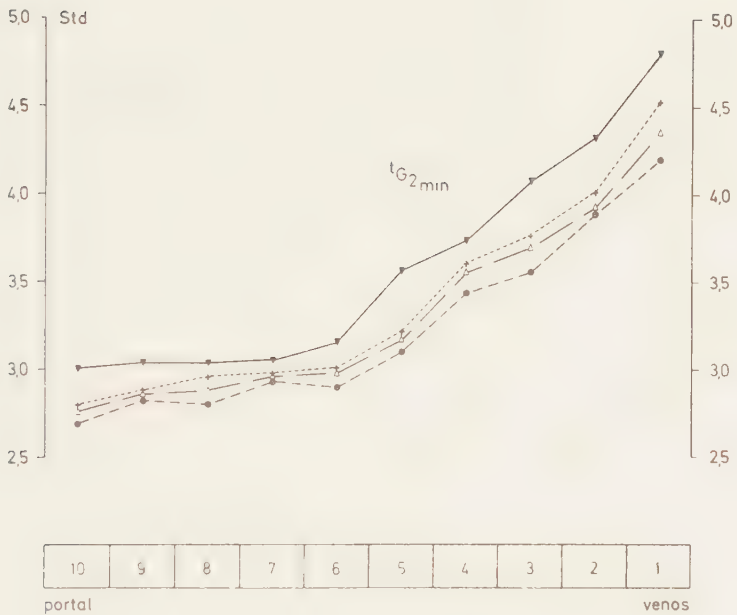


Abb. 27: Den FLM-Kurven für verschiedene Markierungsschwellen entnommene Werte für $t_{G_2 \min}$ (Ordinate) in

Stunden in Abhängigkeit von der Lokalisation der ausgewerteten Zone im Lobulus (Abszisse).

Markierungsschwellen:

3 SK (●—●), 5 SK (Δ—...—Δ),
8 SK (+-----+) und 15 SK (▼—▼).



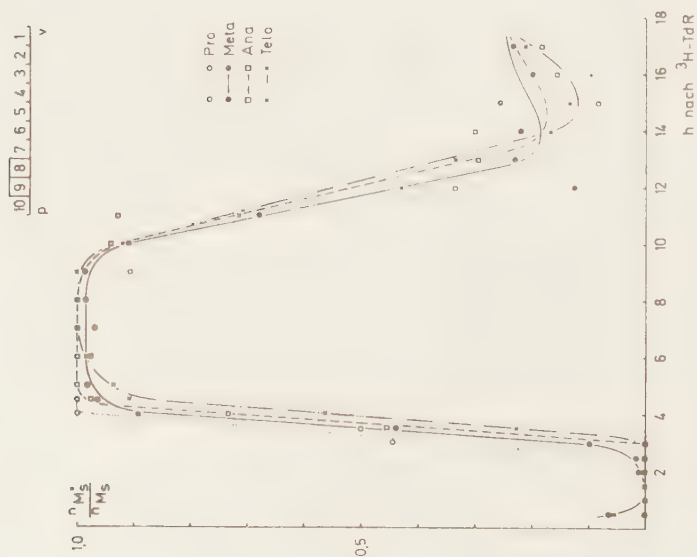
Abb. 28: Den FILM-Kurven für verschiedene Markierungsschwellen entnommene Werte für $t_{M \max}$ (Ordinate) in Stunden in Abhängigkeit von der Lokalisation der ausgewerteten Zone im Lobulus (Abszisse).

Markierungsschwellen:

5 SK (●—●), 5 SK (Δ—Δ),
8 SK (+----+) und 15 SK (▼—▼).

Markierungsschwelle (in SK)	t_C	t_{G_1}
15	33,0	20,9
8	33,2	20,1
5	33,0	19,9
4	33,0	19,7
3	32,8	19,4
2	33,3	18,9
1	-	-

Tab. 3: t_C und t_{G_1} (in Std.) entnommen
 verschiedene Markierungsschwellen
 (MS = 1, 2, 3, 4, 5, 8 bzw. 15 SK)
 o h n e Berücksichtigung der
 Lage der Mitosen im Lobulus
 ("Summenkurve").
 (- = t_C nicht mehr bestimmbar).



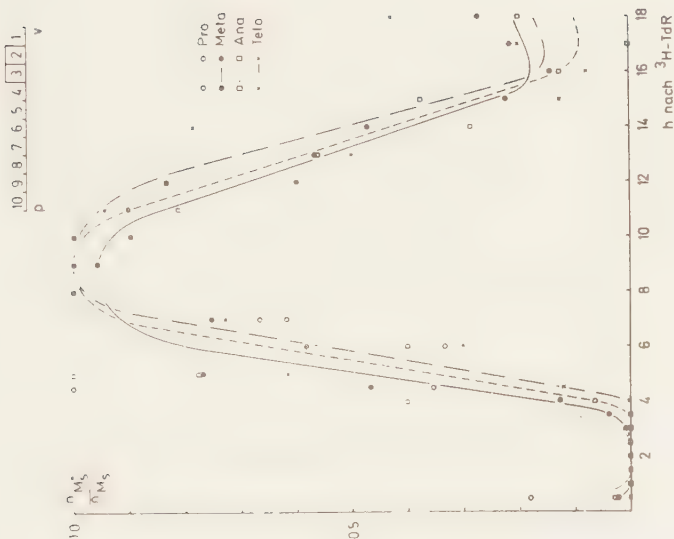
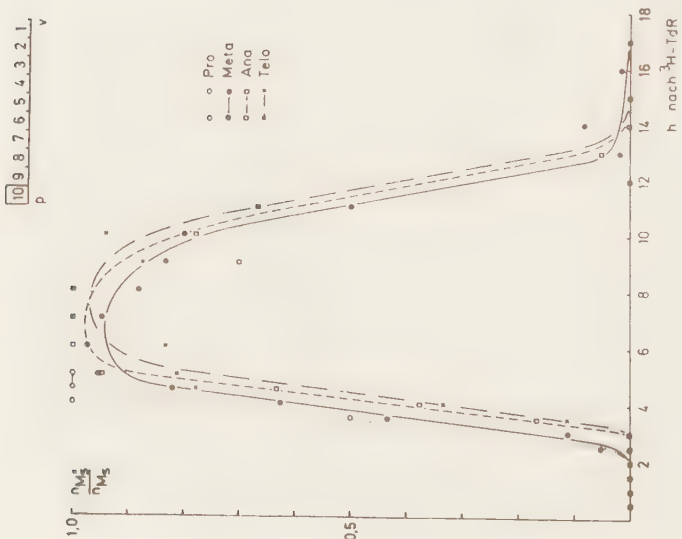
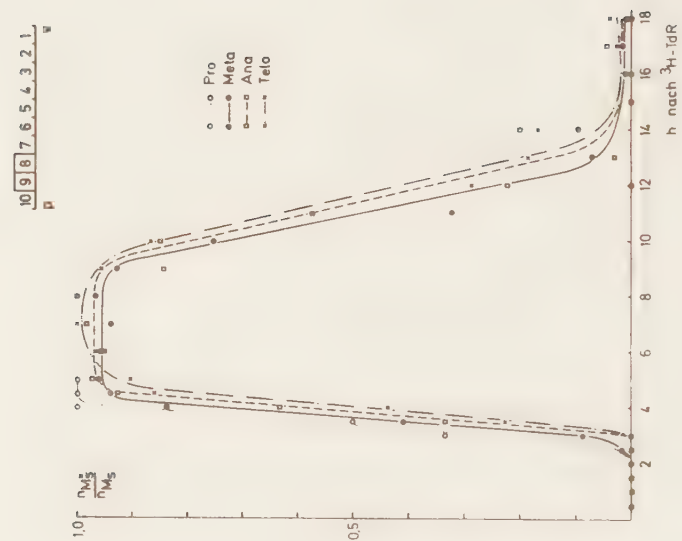


Abb. 29:

Fraktion markierter Mitosen für die Teilphasen Pro-, Meta-, Ana- und Telophase (FLM) (jeweils Ordinate) als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von 3H -TdR (jeweils Abszisse) für 3 ausgewählte Teilbereiche des Leberlobulus (Kennzeichnung durch Umrahmung der Nummern der betreffenden Unterabschnitte auf der Strecke P.S. - T.H.V.). Alle FLM-Kurven erstellt für eine Markierungsschwelle von 3 Silberkörnern.



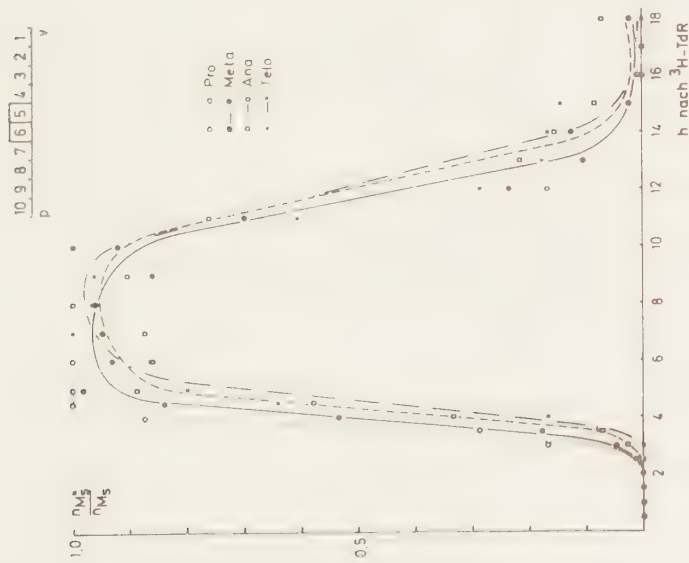
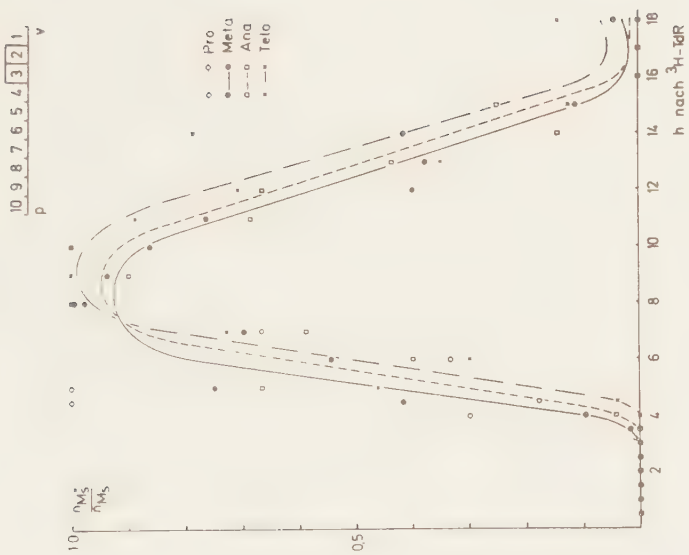


Abb. 30: Alle Kurven der 4 ausgewählten Teilbereiche des Lobulus erstellt für eine Markierungsschwellen von 8 SK (sonst wie Abb. 29).

MS ZONL	3 SK		5 SK		8 SK		15 SK	
	t_C	t_{G_1}	t_C	t_{G_1}	t_C	t_{G_1}	t_C	t_{G_1}
10	54,1	21,2	53,3	20,8	53,3	20,9	55,3	21,8
9	54,0	21,5	53,7	21,6	55,5	21,5	53,5	22,6
8	54,4	21,5	54,4	22,0	54,4	22,1	54,7	23,7
7	54,9	22,0	54,5	22,0	54,4	22,1	54,0	22,3
6	55,3	22,0	54,7	21,9	54,4	21,6	53,7	21,6
5	55,2	21,5	54,3	20,9	53,3	20,2	53,5	21,1
4	58,5	24,3	55,1	21,3	55,0	21,6	54,4	21,4
3	59,1	24,1	55,9	19,4	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 4: t_C und t_{G_1} (in Std.) entnommen den FLM-Markierungsschwellen (MS = 3, 5, 8 bzw. 15 SK) bei Berücksichtigung der Lage der Mitosen im Lobulus (Topik).
(- = nicht mehr bestimmbar).

V. BEEINFLUSSUNG DES MI DURCH DIE TAGESRHYTHMIK UND
DURCH APPLIKATION VON ^3H -THYMIDIN

1. Literaturübersicht

Die Mitoseaktivität der Hepatocyten fällt nach der Geburt mit ausklingendem teilexponentiellem Wachstum stark ab und erreicht mit 3 bis 4 Monaten konstante, in der unbehandelten Leber mit 0,01 % - 0,1 % sehr niedrige Werte (Schultze and Oehlert 1960, Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Stöcker und Altmann 1964, Stöcker und Heine 1965 b, Bucher 1967). Die Zellproliferation im Anschluß an eine Zweidrittel-Hepatektomie bewirkt eine 100-300-fache Erhöhung (Brues and Marble 1937, Cater et al. 1956, Grundmann und Bach 1960, Oehlert et al. 1962). Auf das erste Auftreten von Mitosen, etwa 20 Stunden post operationem, folgt ein schneller Anstieg bis zu einem ersten Maximum zwischen 26 und 33 Stunden (Grisham 1960, Grundmann und Bach 1960, Oehlert et al. 1962, Grisham 1962, Stöcker 1966, Fabrikant 1967 d, Fabrikant 1968, Fabrikant 1969, Grisham 1969). Dabei nimmt der MI einen der DNA-Synthese entsprechenden zeitlichen Verlauf mit portalem Beginn, darauffolgendem intermediärem und schließlich perivenösem Gipfel (Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968). Im Anschluß daran sinken die Werte insgesamt wieder ab, wobei zwischen 52 - 60 Std. noch eine kleinere, 2. Mitosewelle beobachtet werden kann (Fabrikant 1967 d, Fabrikant 1968), die in erster Linie durch Zellteilungen im portalen Drittel des Lobulus bedingt ist. Die Höchstwerte des MI folgen jeweils in 6 - 8-stündigem Abstand auf die Maxima des LI (Stöcker 1966, Fabrikant 1967 d, Fabrikant 1969, Grisham 1969); die absoluten Werte nehmen allgemein mit zunehmendem Alter der Tiere ab (Klinge 1968). Auch über die 64. Std. post operationem hinaus bleibt der MI noch einige Zeit erhöht (Fabrikant 1967 d, Fabrikant 1968). Im Verlauf des allmählichen Rückgangs zu normalen Mitosezahlen finden sich am

9. und 11. Tag noch weitere, aber nur geringe erneute Mitosesteigerungen (Günther et al. 1968).

Die bei der regnerierenden Leber erkennbaren, regelmäßigen circadianen Schwankungen der Mitoseaktivität bewirken frühmorgens bis mittags ein Maximum, nach wechselnd starkem Abfall abends oder nachts ein Minimum (Jaffe 1954, Peters 1962 a, Bade and Echave Llanos 1963, Russo and Echave Llanos 1964, Günther et al. 1968, Klinge und Mathyl 1969). Sie treten gegenüber der typischen inneren, zellulären Proliferationsrhythmik nach Hepatektomie umso deutlicher hervor, je länger dieser ursprüngliche Regenerationsimpuls zurückliegt (Altmann 1966). Nur bei fetalen und sehr jungen Tieren ist ein Tagesrhythmus noch nicht ausgebildet (Peters 1962 a, Wegener et al. 1964).

Eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst die Proliferation, bzw. Mitoseaktivität nach Teilhepatektomie (Literaturübersicht bei Grundmann und Seidel 1969). Entscheidende Auswirkungen hat dabei die Anwesenheit, bzw. das Fehlen von Hormonen wie Adrenalin (Bullough 1965), Corticosteroiden (Leduc 1949) oder Thyroxin (Peters 1962 b); auch Hypophysektomie nach Zweidrittel-Hepatektomie bewirkt eine erhebliche Verminderung der Mitosen (Rabes 1969). Während Hunger 24 Stunden vor oder nach Operation noch keinen nennenswerten Einfluß auf den ersten Mitosegipfel hat (Becker and Lane 1966), führt 48 Stunden langer Futtermangel an der unbehandelten Leber zu einem Absinken der Mitoserate auf Null (Peters 1962 a). Sehr starke Veränderungen des MI, wie Abfall bei Wärme und Steigerung bei Kälte, zeigen auch die Bedeutung der Außentemperatur (Peters 1962 b). Als eine der zahlreichen radiotoxischen Wirkungen von ^3H -TdR (Post and Hoffman 1961, Post and Hoffman 1965 a, Post and Hoffman 1967, Literaturübersicht bei Schultze 1968), kann es nach dessen Applikation an der Leber zur Abnahme der Mitosen (Grisham 1960b, Post and Hoffman 1965 a) wie auch zu verspätetem Auftreten des

ersten MI-Maximums nach der Teilhepatektomie (Grisham 1960b) kommen.

2. Material und Methode

2.1. Mitoseindex in den Zonen 1 bis 10 des Leberlobulus (Topik)

2.1.1. Versuchsanordnung

Tiermaterial, Operation, Injektion von ^3H -TdR, Tötungszeiten und Anfertigung der histologischen Präparate sind identisch mit der in I. 4.1. beschriebenen Anordnung.

2.1.2. Versuchsauswertung

Zur Bestimmung der Mitoseaktivitäten dienten hier die gleichen, in I. schon für die Erstellung der FLM-Kurve verwendeten und mit einem Okularzählraster nach ihrer Lokalisation im Acinus differenzierten Mitosen. Dazu wurde aus der gemessenen Entfernung P.S. - T.H.V. und der vorgegebenen Breite von 7 Rastereinheiten zu je 42,6 μm die durchschnittliche Fläche des untersuchten Leberbereichs berechnet. Darauf folgte (wie in IV. 2.2. beschrieben), die Bestimmung der mittleren Hepatocytenzahl pro Rasterquadrat der Kantenlänge 42,6 μm . Mit beiden Werten war es möglich, die Summe aller Zellen in den Zonen 1 bis 10 eines durchschnittlich langen, in der Breite begrenzten, Leberlobulus anzugeben.

Aus der daraus abgeleiteten durchschnittlichen Zellzahl für eine Zone, der Summe der jeweils insgesamt aus einer bestimmten Lobuluszone gezählten Mitosen und der Gesamtzahl dabei durchgemusterter Zonen, ließ sich für jede einzelne Zone (eines Versuchstieres), die Mitoseaktivität berechnen. Dann wurden von 55 so ausgewerteten Tieren die

einzelnen Mitoseindices aus jeweils gleichen Zonen zusammengefaßt und für jeden der 10 Lobulus-Unterabschnitte der mittlere Mitoseindex, der zugehörige mittlere Fehler des Mittelwertes und die Standardabweichung bestimmt (Abb. 31 und Tab. 5). Alle Werte beziehen sich auf den Zeitpunkt 65 Std. nach Teilhepatektomie.

Bei 40 Leberlobuli wurden jeweils die in jeder einzelnen der 10 Zonen befindlichen Hepatocyten gezählt und damit für jeden Unterabschnitt gesondert die mittlere Zelldichte sowie der prozentuale Anteil der dortigen Zellen an der Gesamtzahl aus allen 10 Zonen festgelegt. Dann folgte die Korrektur des oben mit einem hypothetischen, für alle Lobuluszonen gleichen, 10%-igen Zellanteils errechneten Mitoseindex durch Berücksichtigung des tatsächlich auf eine bestimmte Lobuluszone fallenden Prozentsatzes von darin befindlichen Zellen (Abb. 31).

Aus den für einzelne Zonen (durch Zell- und Mitosezählungen) berechneten Mitoseaktivitäten und ihren zugehörigen mittleren Mitosezeiten (siehe III. 3.) wurde mit Hilfe ihres Quotienten die relative Häufigkeit des Eintretens in eine Mitose für verschiedene Bereiche des Leberacinus ermittelt. Von den untersuchten Lobulusbereichen 10, 8 + 9, 5 + 6 und 2 + 3 erhielt 8 + 9 willkürlich die Häufigkeit 1 zugeordnet. Für die übrigen Zonen ergibt sich ihr nun darauf bezogener Relativwert durch Multiplikation der jeweiligen Häufigkeit mit dem Quotienten aus 1 und der vorher für den Bereich 8 + 9 gemessenen Häufigkeit (Abb. 32).

2.2. Einfluß des Zeitpunkts der Applikation von Hanks- lösung, inaktivem TdR und ^3H -TdR und der Tötungs- zeit auf den Mitoseindex der Hepatocyten 65 Stunden nach Teilhepatektomie

2.2.1. Versuchsanordnungen

2.2.1.1. Tiermaterial, Operation, Injektion von ^3H -TdR, Tötungszeitpunkt und Anfertigung der histologischen Präparate sind gleich wie in Absatz I. (siehe dort). Dabei wurde je einer von 55 teilhepatektomierten Ratten (Gruppe D) zur 15., 16., 17., usw. bis 64 1/2. Stunde nach Hepatektomie in anfangs 60-minütigem, später 30-minütigem Abstand 0,2 $\mu\text{Ci/g}$ Körpergewicht ^3H -TdR in 0,8 ml Hankslösung injiziert.

2.2.1.2. 120 männliche Wistarratten (AF/Han) von 202,57 g $\pm$ 12,5 g Gewicht, erhielten Futter (Altromin-Standarddiät) und Wasser ad libitum. Zwischen 0 Uhr und 3 Uhr erfolgte bei allen eine typische Zweidrittel-Hepatektomie (Higgins and Anderson 1931) und danach Aufteilung in 3 Gruppen A, B und C zu je 30, 60 und 30 Tieren. Zur 40., 41., 42., usw. bis 59. Stunde post operationem wurden in 60-Minütigem, dann von der 60. bis 64 1/2. Stunde in 30-minütigem Zeitintervall intraperitoneale Injektionen vorgenommen. Dabei erhielten von Gruppe A jeweils eine Ratte 0,8 ml Salzlösung nach Hanks, aus B je 2 Tiere zum selben Zeitpunkt 0,8 ml Hankslösung mit 0,032 μMol inaktivem TdR (= 7,74 μg TdR) und aus C je ein Tier 0,2 $\mu\text{Ci/g}$ Körpergewicht ^3H -TdR (spezifische Aktivität 5 Ci/mM; Radiochemical Centre Amersham), ebenfalls in 0,8 ml Hankslösung (entspricht 0,032 μMol ^3H -TdR/Ratte). Sämtliche Tiere wurden 65 Std. nach der Teilhepatektomie durch Nackenschlag getötet.

2.2.2. Versuchsauswertung

Bei allen Tieren wurden die Lebern entnommen, in etwa 3 mm starke, flache Scheibchen zerteilt und in 10 % Formol unter Zusatz von 0,1 mg/ml inaktivem TdR fixiert. Nach Paraffineinbettung wurden jeweils vom Lobus dexter Schnitte von 3 - 4 μ m Dicke angefertigt; nur jeder 3. oder 4. Schnitt wurde weiterverarbeitet, die dazwischenliegenden verworfen. Anschließend folgte die Färbung mit Hämalaun-Eosin.

Bei 625-facher Vergrößerung wurden mit einem Okularraster jeweils 25 gleichgroße Quadrate von 42,6 μ m Kantenlänge in das Blickfeld eingespiegelt. Dann wurden an den obigen Parenchymschnitten innerhalb der Rasterquadrate befindliche Mitosen gezählt und für jedes Tier mindestens 500 solcher gerasterter Blickfelder ausgewertet. Nach Bestimmung der im Durchschnitt pro Quadrat von 42,6 μ m Kantenlänge auftretenden Hepatocyten (analog zu IV. 2.2.) folgte gesondert die Berechnung der im Verlauf der Mitosezählung insgesamt pro Tier durchgemusterten Parenchymzellen; sie ermöglichte, zusammen mit der zugehörigen Mitosezahl, die Ermittlung des jeweiligen Mitoseindex.

Innerhalb der Gruppe B und auch zwischen C und D wurden noch von jeweils völlig gleich behandelten Tieren die einander entsprechenden Mitosewerte zusammengefaßt. Anschließend wurden die Mitoseindices in graphischen Darstellungen als Funktion der Zeit nach Injektion der einzelnen untersuchten Lösung aufgetragen (Hankslösung (A) = Abb. 33; inaktives TdR (B) = Abb. 34; ^3H -TdR (C und D) = Abb. 35; ^3H -TdR (D) = Abb. 35 a). Die Mitoseaktivitäten der mit ^3H -TdR injizierten Tiere (C und D) wurden außerdem in Abhängigkeit von der jeweiligen Tageszeit, bei Tötung aufgezeichnet (Abb. 36). (Da die Tiere der Gruppe D in zwei Abteilungen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen getötet wurden, ergeben sich zusammen mit Gruppe C drei MI-Tagesverläufe).

3. Ergebnisse

3.1. Zonale Verteilung der Mitosen 65 Stunden nach Zweidrittel-Hepatektomie

3.1.1. Mitoseindex in den Zonen 1 - 10 des Leberlobulus (Abb. 31)

65 Stunden nach Zweidrittel-Hepatektomie liegt das Mitosemaximum mit 0,6 % portal in Zone 9. Von hier aus nimmt der MI in Richtung auf die T.H.V. bis hin zu Zone 3 langsam ab; dann fallen perivenös die Werte wesentlich rascher und erreichen ihr Minimum in Zone 1 mit weniger als 0,2 % Mitosen. Auch in Zone 10 bleibt der MI etwas hinter dem der unmittelbar benachbarten Unterabschnitte zurück. Die zugehörigen mittleren Fehler des Mittelwertes des MI sind in den meisten Zonen etwa gleich und vergleichsweise klein. Perivenös sind die mittleren Fehler bei zugleich erheblich gesunkenen Mitosezahlen absolut ebenfalls geringer.

Der auf die einzelnen Zonen des Lobulus treffende Prozentsatz der Zellen aller 10 Unterabschnitte liegt in Zone 5 bis 8 zwischen 10,2 % und 10,5 % (Tab. 6); er bleibt damit nur knapp über dem theoretischen Mittel von 10 % pro Zone. Auf Zone 9 treffen schon deutlich mehr Zellen und die Zone 10 besitzt mit 12,2 % der Zellen des Zehner-Lobulus die höchste Zelldichte. Dagegen nimmt sie venös von Zone 5 bis zur T.H.V. stetig ab, bis sich beim Minimum in der Zone 1 nur noch rund 8,1 % der Zellen des ausgewerteten Leberparenchymstreifens darin befinden.

Mit diesen Werten werden die Mitoseindices, deren Berechnung zuerst mit einer für alle Zonen angenommen gleichen Zellzahl von 10 % erfolgte, korrigiert. Die Mitoseaktivitäten liegen jetzt dort niedriger als die eingangs bestimmten, wo tatsächlich mehr als 10 % aller Zellen des ausgewerteten Leberparenchymstreifens vorhanden sind; entsprechend größer sind die korrigierten Mitoseindices in den

Zonen mit weniger als 10 %, wo sich die ausgezählten Mitosen auf eine geringere Zellzahl als ursprünglich angenommen, beziehen. Nach dieser Umrechnung liegt das portale MI-Maximum etwas niedriger als bei der ersten Kurve und ist nur noch um wenig höher als ein nun mehr hervortretender, weiterer Mitosegipfel in den Zonen 3 und 4. In den Abschnitten dazwischen zeigt die Mitoseaktivität jetzt eine mäßige, flache Einsenkung. Der perivenös steile Abfall der MI-Werte bleibt im wesentlichen erhalten. In Zone 10 hat sich der MI durch die Korrektur am stärksten verändert und ist nun gleich erheblich niedriger als in den anderen, angrenzenden portalen Unterabschnitten.

3.1.2. Relative Häufigkeit des Mitoseeintritts in verschiedenen Lobulusbereichen

Da der aus Mitose- und Gesamtzellzahl berechnete MI stark von der jeweiligen Mitosedauer abhängt, darf man von gleicher Mitoseaktivität nicht unmittelbar auch auf gleiche Häufigkeit des Mitoseeintritts schließen. Erst bei Berücksichtigung der einzelnen Mitosezeiten lassen sich etwaige zonale Unterschiede des Zellflusses in die Mitose feststellen (Abb. 32). Nach entsprechender Umrechnung des jeweiligen MI zeigt sich (für den Zeitpunkt 65 Std. nach Hepatektomie) eine vom portalen Maximum (Zone 8 + 9) nach intermediär (5 + 6) und näher zur T.H.V. zu (2 + 3) auf weniger als die Hälfte abnehmende Eintrittshäufigkeit; demgegenüber bleibt die zugehörige Änderung des MI zwischen diesen Lobulusbereichen vergleichsweise gering (siehe Abb. 31). Wie venös ist auch in der periportalen Zone 10 der Zellfluß in die Mitose nur noch wenig mehr als halb so groß als beim Maximum im unmittelbar angrenzenden Bereich 8 + 9.

5.2. Mitoseindex in Abhängigkeit von Injektions- und Tötungszeitpunkt

5.2.1. Injektion von Hankslösung (Abb. 33)

Bei den mit Hankslösung injizierten Tieren (Gruppe A), sind fast im gesamten Versuchszeitraum die Schwankungen der einzelnen MI-Werte recht stark. Nur zwischen 10 und 16 Stunden ist zugleich mit den Mitosewerten auch die Streuung etwas geringer. Insgesamt läßt die stark wechselnde Lage aufeinanderfolgender Kurvenpunkte keine näheren Angaben über einen bestimmten Verlauf der Mitoseaktivität zu. Erst nach Glättung der Kurvenlinie (graphische Durchführung analog wie bei den FLM-Kurven; siehe I. 4.4.) zeigt sich, daß der MI von den ersten Versuchsstunden (mit Werten um 0,3 %) sehr langsam bis zu einem Minimum um 14 Stunden nach Applikation von Hankslösung abfällt; darauf folgt bis 24 Std. ein nun etwas steilerer Anstieg.

5.2.2. Injektion von Hankslösung mit inaktivem Thymidin (Abb. 34)

Nach Injektionen von inaktivem TdR in Hankslösung zeigt die geglättete MI-Kurve nahezu denselben Verlauf wie schon bei alleiniger Hanks-Applikation (vgl. Abb. 33). Nur der Wiederanstieg der Mitoseaktivität zum Ende des Versuchszeitraums zu, im Anschluß an das etwa an gleicher Stelle gelegene MI-Minimum, ist etwas steiler. Im Gegensatz zur Abb. 33 (Tiergruppe A) ist hier dieser Kurvenverlauf aber schon übersichtsweise aus den einzelnen aufeinanderfolgenden MI-Werten erkennbar. Den wesentlich geringeren individuellen Schwankungen liegt u.a. zugrunde, daß jeder Kurvenpunkt schon einen Mittelwert von 2 Tieren darstellt.

3.2.3. Injektion von ^3H -Thymidin (Abb. 35)

Von einem MI-Maximum mit ca. 0,5 % Mitosen in den ersten Stunden nach ^3H -TdR-Injektion fallen die Werte rasch und nahezu kontinuierlich bis auf etwa ein Drittel beim Minimum um 14 Std. Der sich daran anschließende neuerliche kurze und relativ steile MI-Anstieg geht später über in einen bis zum Ende der Versuchszeit bei 25 Std. wellenrömigen Verlauf. Die Schwankungen der Kurvenpunkte sind beim Wiederanstieg des MI und danach etwas stärker als vor dem Minimum. Die einzelnen Mitoseindices liegen hier im Bereich bis 14 Std. umso höher über den entsprechenden Werten mit gleicher Versuchszeit, aber Injektion von Hankslösung oder inaktivem TdR (vgl. Abb. 33 und Abb. 34), je kürzer das Zeitintervall zwischen ^3H -TdR-Applikation und Tötung wird. In den ersten Stunden nach ^3H -TdR-Injektion sind die Mitosezahlen sogar rund doppelt so hoch wie bei den anderen, zeitlich vergleichbaren Mitoseindices. Bereits die jeweiligen MI-Minima liegen bei allen 3 Kurven (d.h. für alleinige Hankslösung, inaktives TdR und ^3H -TdR) zeitlich an etwa gleicher Stelle und auf ähnlicher Höhe.

Bei alleiniger Auswertung der Tiere der Gruppe D (Abb. 35 a) werden in den ersten Stunden nach ^3H -TdR-Injektion besonders hohe Mitoseindices von rund 0,8 % gefunden; dann fallen die Werte wieder rasch und fast gleichmäßig bis auf ein Minimum von ca. 0,2 % Mitosen zwischen 12 und 16 Std. Anschließend steigt der MI erneut an, wobei die Streuung der Einzelwerte gering zunimmt. Um 26 bis 28 Std. erreicht der MI sprunghaft wieder ähnlich hohe Werte wie in den ersten Versuchsstunden. Nach der folgenden erneuten, raschen Abnahme bleiben die Mitoseindices im weiteren Verlauf bis zum Versuchszeitende (bei 50 Std.) trotz starker individueller Schwankungen auf einem, gemessen an den maximalen und minimalen Werten, mittleren Niveau.

3.2.4. Einfluß des Tötungszeitpunkts auf den Mitoseindex (Abb. 36)

Die Einzelwerte der an drei verschiedenen Tötungstagen ausgewerteten MI-Serien fallen nicht immer auf absolut gleiche Tageszeiten. So sind besonders am Beginn und am Ende des Tötungszeitraumes nur noch MI-Werte aus zwei oder einer der Serien vorhanden, weshalb dort auch individuelle Schwankungen und Abweichungen der jeweils gemessenen Mitoseaktivitäten vom allgemeinen Kurvenverlauf besonders deutlich werden.

Die Mitoseaktivität hat ihre Höchstwerte bei 15 Uhr, zu Beginn des hier beobachteten Tageszeitraumes. In den nächsten Stunden fällt sie rasch und stetig ab und erreicht zwischen 19 Uhr und 19.30 Uhr die niedrigsten Werte. Ab 20 Uhr steigt der MI dann insgesamt wieder leicht an. Bei den danach gemessenen Mitoseindices, die nur jeweils auf der Auswertung eines einzigen Tieres beruhen, werden die starken individuellen Schwankungen besonders deutlich. Sie lassen möglicherweise weitere noch auftretende MI-Verlaufsänderungen kaum mehr erkennen, bzw. täuschen nicht vorhandene vor.

4. Diskussion

4.1. Zonale Verteilung der Mitosen 65 Stunden nach Zweidrittel-Hepatektomie

Die hier angewendete Methode, den MI aus der jeweiligen Gesamtmitosezahl in einer Lobuluszone und der indirekt berechneten Summe aller dabei durchgemusterter Zellen (aus durchschnittlicher Zelldichte pro Zone und der Zahl dieser bei der Mitosezählung ausgewerteten Unterabschnitte) zu bestimmen, gewährleistet auch bei relativ geringer Mitoseaktivität, wie z.B. 65 Std. nach Teilhepatektomie,

zuverlässige Werte. Weil dabei nur die Mitosen, nicht aber die übrigen Hepatocyten gewertet werden müssen, können in der selben Zeit weit mehr Mitosen nach Zahl und Lokalisation erfaßt werden als bei gleichzeitiger Auszählung.

Zwischen T.H.V. und P.S. steigt die Zelldichte der Hepatocyten an. Sie liegt intermediär bis periportal immer über dem Durchschnitt für den gesamten Lobulus; im venösen Bereich bleibt sie zunehmend deutlich darunter. Die stärkste Abweichung von der durchschnittlichen Zelldichte findet sich unmittelbar periportal in Zone 10, wo auch besonders viele kleine, zweikernige Hepatocyten anzutreffen sind (Grundmann und Bach 1960, Fabrikant 1967 c). Wird nun bei der indirekten Zellzahlbestimmung willkürlich für alle 10 Unterabschnitte des Lobulus gleiche Zelldichte angenommen, so ergeben sich, weil tatsächlich erhebliche zonale Unterschiede bestehen, ohne entsprechende Korrektur Mitosewerte, die gegenüber denen mit Berücksichtigung der jeweiligen Zelldichte systematische Abweichungen zeigen. Die zuerst bestimmten Mitoseindices liegen im Vergleich zu den berichtigten portal und in fast allen intermediären Zonen etwas zu hoch, in venösen Bereichen aber entsprechend zu niedrig. Grundlegende Änderungen des MI-Verlaufes zwischen T.H.V. und P.S. ergeben sich aber durch eine nachträgliche Korrektur der zuerst für konstante Zelldichte im Lobulus berechneten MI-Werte nicht.

Mit 0,2 % bis 0,6 %, je nach Lokalisation im Lobulus, liegt die Mitoseaktivität hier 65 Std. nach Teilhepatektomie schon 10-fach niedriger als zum Zeitpunkt des ersten Mitosegipfels bei etwa 30 Stunden mit ca. 4 - 6 % Mitosen (Grisham 1962, Stöcker 1966, Fabrikant 1967 d, Fabrikant 1968); sie ist damit aber noch deutlich höher als an der unbehandelten Leber, wo nur 0,01 - 0,1 % Mitosen anzutreffen sind (Schultze and Oehlert 1960, Oehlert et al. 1962, Stöcker und Altmann 1964, Stöcker

und Heine 1965 b, Bucher 1967). Die vorliegenden Mitoseindices stimmen dagegen größenmäßig gut mit dem schon in einem Vorversuch (I. 3.) um 60 - 68 Stunden post operationem gefundenen 2. Mitosegipfel überein (vgl. Abb. 1). Die hier von einem portalen Maximum zur T.H.V. zuerst allmählich, dann stärker abnehmende Zahl von Mitosen ist wohl Folge einer 2. Mitosewelle nach Teilhepatektomie, die in erster Linie durch Zellteilungen im portalen Drittel des Acinus hervorgerufen wird (Fabrikant 1967 c, Fabrikant 1968).

Schon für eine Dreiteilung des Lobulus zwischen P.S. und T.H.V. wurde der gleichartige topische Verlauf von LI und MI nach Zweidrittel-Hepatektomie sichtbar (Fabrikant 1967 c). Er bestätigt sich nun zum untersuchten Zeitpunkt 65 Std. auch für wesentlich kleinere Bereiche, da sich die hier zonal gemessenen Mitoseaktivitäten und der zeitlich etwa zugehörige LI bei 56 Std. (vgl. Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970) weitgehend entsprechen. Die dort als Zeichen einer 2. postoperativen DNA-Synthesewelle angesehene portal hohe, nach venös allgemein abnehmende Zahl markierter Hepatocyten verursacht dann hier den ähnlichen Verlauf des MI zwischen P.S. und T.H.V. Die zeitliche Versetzung erklärt sich aus dem bekannten Abstand miteinander korrespondierender Werte des LI und MI von 6 - 8 Stunden (Stöcker 1966, Fabrikant 1967 d, Fabrikant 1969, Grisham 1969).

Wie die zwischen 48 und 56 Stunden post operationem im venösen Bereich langsam abnehmenden markierten Zellen als allmählich verschwindender Rest der 1. DNA-Synthesewelle zu betrachten sind (Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970), kann man nun analog dazu hier bei 65 Stunden die venös sogar noch vergleichsweise zahlreich vorkommenden Mitosen als letzten Überrest der weit in den venösen Bereich verlagerten 1. postoperativen Mitosewelle betrachten. Die leichte Einsenkung zwischen höheren portalen (Folge der

2. Mitosewelle) und venösen (Rest der 1. Mitosewelle) Mitoseindices deutet wie beim LI (vgl. Rabes und Tuczek 1970) auch hier beim MI den in venösen, gegenüber intermediären Bereichen verzögerten Rückgang der 1. Proliferationswelle an. Die von der ersten DNA-Synthesewelle nach Teilhepatektomie bekannte Sonderstellung der unmittelbar periportal gelegenen Hepatocyten (Rabes und Tuczek 1967, Rabes und Tuczek 1970, Tuczek 1970) wird erneut aus der in Zone 10 deutlich geringeren Mitosezahl im Vergleich zu anderen, direkt angrenzenden, portalen Unterabschnitten erkennbar. Zugrunde liegt dem die bei 56 bis 72 Stunden post operationem dort auch entsprechend geringere Zahl DNA-synthetisierender Zellen.

Die alleinige Betrachtung des MI gestattet noch keine genauen Angaben über eine echte Mitosevermehrung bzw. über die jeweilige Stärke des Zellflusses in die Mitosephase, weil die Mitoseaktivität sehr stark von der individuellen Mitosedauer abhängig ist. Beispielsweise ist ein postoperativer, initialer Mitosegipfel auch keine echte Steigerung der Zellvermehrung, sondern nur Zeichen eines verlangsamteten Mitoseablaufs (Altmann 1966). Erst durch Einbeziehung der, hier je nach Lobuluszone, unterschiedlichen Teilungsdauern erhält man die tatsächliche Anzahl der in der Zeiteinheit von G_2 nach M übertretenden Zellen. Es zeigt sich, daß der nur geringen Abnahme des MI vom portalen Maximum nach intermediär und venös, wie auch zu den unmittelbar periportal gelegenen Hepatocyten eine zwar jeweils gleich gerichtete, aber mehrfach stärkere Abnahme des Zellflusses in die Mitose gegenübersteht. Dabei bewirkt beispielsweise die im Bereich 8 + 9 im Vergleich zu anderen Zonen kürzere Verweildauer in der Teilungsphase (vgl. III. 3.), daß trotz dortigem hohen Zellfluß in das M-Kompartiment der gemessene MI relativ gering bleibt. Deutliche topische Unterschiede im Zellfluß bleiben somit verdeckt, solange die einzelnen Mitosezeiten nicht mit

betrachtet werden. Insgesamt sind bei in die Mitose tretenden Leberzellen neben Zellfluß-Schwankungen im Zeitablauf nach Teilhepatektomie (Fabrikant 1967 d, Fabrikant 1968, Tuczek und Rabes 1973) und systematischen Schwankungen im Tagesrhythmus (Jaffe 1954, Fabrikant 1967 c, u.a.), auch noch je nach Lokalisation im Lobulus wechselnde Zellflußraten zu beachten.

4.2. Mitoseindex in Abhängigkeit von Injektions- und Tötungszeitpunkt

Die indirekte Bestimmung des MI mit Mitosezählungen und getrennter Berechnung der zugehörigen Zellzahl gewährleistet wiederum (vgl. 4.1.) die rasche Auswertung vieler histologischer Schnitte, bzw. großer Parenchymflächen und damit gut gesicherte Einzelwerte. Zusätzliche methodische Fehler aufgrund unterschiedlicher Zelldichten in verschiedenen Bereichen von Leberschnitt oder Acinus sind durch den Zählmodus weitgehend ausgeschaltet: Die für alle Präparate immer gleichartige mäanderförmige Durchmusterung verhindert die Bevorzugung bestimmter Regionen von Schnitt oder Lobulus und damit nur durch eventuell regional unterschiedliche Zelldichten vorgetauschte Änderungen von MI-Werten.

Nach Teilhepatektomie und Tötung der Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten ist eine innere zelluläre Proliferationsrhythmik, die mit Entfernung zum Regenerationsimpuls abnimmt, von entsprechend stärker hervortretenden Tageschwankungen (Altmann 1966, Klinge und Mathyl 1969) zu unterscheiden. Wenn, wie hier, alle Tiere zur gleichen Zeit (65 Std. nach Hepatektomie) getötet wurden, kann man durch entsprechende Anordnung der einzelnen MI-Werte die Tagesrhythmik erfassen. So ist das insgesamt allmähliche Absinken der Mitoseaktivität von den Höchstwerten am frühen

Nachmittag bis zu einem Minimum in den ersten Abendstunden (ungeachtet der relativ stark schwankenden Einzelwerte), als ein Teilabschnitt der bekannten circadianen Rhythmik der Zellteilung (Jaffe 1954, Peters 1962 a, Oehlert und Block 1962, Fode und Echave Illanos 1963, Fabrikant 1967 c, Günther et al. 1968, Klinge und Mathyl 1969, van Cantfort and Barbason 1972) anzusehen. Während aus dem hier untersuchten Tageszeitraum eine Übereinstimmung mit den allgemein morgens bis vormittags anzutreffenden Tageshöchstwerten nicht beurteilt werden kann, fallen die niedrigsten hier gemessenen Mitoseaktivitäten eindeutig in den Zeitbereich des zwischen den frühen Abendstunden und der Nacht auftretenden Tagesminimums. Auch der sich üblicherweise daran anschließende nächtliche Wiederanstieg des MI (z.B. Peters 1962 a), ist aus dem Verlauf der Kurve ab ca. 20 Uhr andeutungsweise erkennbar. Verursacht werden solche in regelmäßiger Folge erscheinenden, eine Teilsynchronisation darstellenden Schwankungen des MI durch tageszeitliche Verschiebung der DNA-Synthesemaxima (Klinge und Mathyl 1969). Diese gehen einher mit tageszeitlichem, rhythmischen Wechsel der Eintrittsrate in die DNA-Synthese und entsprechender Änderung des LI (Fabrikant 1967 c).

Bei zu verschiedenen Zeiten nach Teilhepatektomie erfolgter Applikation von Hankslösung, inaktivem TdR oder ^3H -TdR (Abb. 33 - 35) zeigt der MI (immer für 65 Std. post op.), im Anschluß an ein jeweils gleich gelagertes Minimum zwischen 12 und 14 Std. Versuchszeit, für alle Substanzen etwa gleichartigen Verlauf; nur die Einzelwerte schwanken verschieden stark. Vor diesem Zeitpunkt werden mit Verkürzung des Intervalls zwischen Injektion und Totung Mitosen bei Tieren mit ^3H -TdR zunehmend häufiger als bei denen mit inaktivem TdR oder Hankslösung.

Ursache des flach wellenförmigen Verlaufs des MI bei Verabreichung von Hankslösung dürfte die circadiane Rhythmik

der Zellteilung sein; so sind etwa die Tiere mit den niedrigsten Mitosezahlen am frühen Abend, zur Zeit des üblichen Tagesminimums getötet worden. Der in den Stunden davor sichtbare flache Abfall, bzw. der spätere Wiederanstieg des MI, erklärt sich dann aus der Tötung der Tiere kurz vor, bzw. kurz nach dem Tagesminimum. Da die Mitoseaktivität bei Injektion von inaktivem TdR mit Hankslösung, keinen nennenswert geänderten Verlauf gegenüber alleiniger Applikation von Hankslösung zeigt, dürften die im Versuch verwendeten Mengen inaktiven Thymidins (entsprechend 0,8 $\mu\text{Ci/g}$ Körpergewicht $^3\text{H-TdR}$) zu klein sein, um besondere Änderungen der Zellkinetik zu bewirken. Eine schon bei "kaltem" TdR mögliche Steigerung der Mitoseaktivität durch Verkürzung der DNA-Synthesezeit (Greulich et al. 1961) oder die Verlängerung von Metaphasen (Ames and Mitra 1967), ist hier nicht festzustellen. Der Verlauf des MI nach Gabe von Hankslösung mit inaktivem TdR entspricht vollständig dem zeitlich gleich gelagerten Ausschnitt aus der circadianen Rhythmik, der sich bei alleiniger Applikation von Hankslösung darstellt.

Beim Vergleich des MI zweier, an aufeinanderfolgenden Tagen in jeweils gleichem Zeitbereich getöteten Tiergruppen (0 bis 25 Std. und 26 bis 50 Std. nach $^3\text{H-TdR}$ -Injektion) (Abb. 35 a), zeigt sich für die kurzen radioaktiven Versuchszeiten (0 - 25 Std.) ein insgesamt stärkerer und erheblich regelmäßiger Abfall der Mitosezahlen, ohne stärkere Schwankungen der Einzelwerte. Dieser Unterschied der Mitoseaktivitäten kann nicht vom Tagesrhythmus bedingt sein, sondern muß in erster Linie mit dem, bei den einzelnen Tieren unterschiedlich langen Zeitabstand zur Injektion zusammenhängen. Auch der bei Applikation von $^3\text{H-TdR}$ (Abb. 35) gegenüber Hankslösung (Abb. 33) oder inaktivem TdR (Abb. 34) von deutlich höheren Anfangswerten ausgehende und erheblich steiler bis zum Minimum bei 12 - 14 Std. abfallende MI läßt sich nicht allein durch einen nur zu-

fällig stärker hervortretenden Tagesrhythmus erklären. Dagegen ist ebenfalls an eine besondere Auswirkung der Injektion zu denken, weil der MI umso höher wird, je kürzer die Injektion vor der Tötung des Tieres erfolgt. Hauptgrund dieser systematisch veränderten Mitosezahlen kann eine mit der Zeit abnehmende Streßwirkung der Injektion nicht sein, sonst müßten die Kurvenverläufe des MI für Applikation von Hankslösung, inaktivem TdR und ^3H -TdR weitgehend gleich sein. Außerdem senkt die Freisetzung von Glukokortikoiden oder Adrenalin im allgemeinen die Mitoseaktivität (Leduc 1949, Bullough 1952, Bullough 1965), so daß bei kurzen Versuchszeiten eher geringere Mitoseindizes die Folge sein müßten. Ebenso ist ein Wechsel der Außentemperatur als Ursache von MI-Änderungen (Peters 1962 b) hier auszuschließen, da alle Tiere zur gleichen Zeit am gleichen Platz und unter völlig identischen Bedingungen gehalten wurden.

Letzter wesentlicher Unterschied zwischen den Versuchsgruppen mit jeweils etwa gleichen tageszeitlichen Tötungszeitpunkten, aber dennoch unterschiedlichen Mitoseindizes, bleibt die Verwendung von ^3H -TdR an Stelle von inaktivem TdR. Meist werden jedoch selbst bei ^3H -TdR-Dosen von 1,0 $\mu\text{Ci/g}$ Körpergewicht, d.h. höheren als den hier verwendeten, noch keine Änderungen im Zellzyklusablauf oder radiotoxische Wirkungen festgestellt (Post and Hoffman 1965 a, Schultze and Maurer 1972). Erst ab 2,0 $\mu\text{Ci/g}$ und mehr werden größere Veränderungen im beobachteten biologischen System sichtbar (Post and Hoffman 1961, Post and Hoffman 1967), was vor allem durch das Tritium und nicht durch die TdR-Menge bedingt ist. Das aber vereinzelt auch schon geringere Dosen (unter 1 $\mu\text{Ci/g}$ ^3H -TdR) Veränderungen wie MI-Verminderung, Mitosestörungen oder Verlagerung des Mitosegipfels bewirken können, zeigen Versuche an der regenerierenden Leber junger Ratten (Grisham 1960 b). Es ist deshalb anzunehmen, daß auch hier die vergleichsweise

geringen ^3H -TdR-Dosen, zumindest kurzfristig nach Applikation, die proliferierenden Zellen derart beeinflussen, daß die Zahl der bei Tötung zu beobachtenden Zellteilungen zunimmt. Als Ursache denkbar wäre eine durch extracelluläre Tritiumstrahlung bedingte geringe passagere Verlangsamung des Mitoseablaufs, die den MI erhöht. Die Wirkung auf den Mitoseablauf müßte dann noch rasch nachlassen, je länger die ^3H -TdR-Applikation zurückliegt. Solche allein durch Verzögerung des Mitoseablaufs hervorgerufenen Mitosegipfel sind post operationem bei Leber und Niere bekannt (Grundmann und Bach 1960, Oehlert et al. 1962, Stöcker und Heine 1965 a); sie treten dort noch vor Beginn der eigentlichen Regenerationswelle auf.

Aus dem Mitoseminimum für Tiere, die 12 - 14 Stunden vor Tötung eine ^3H -TdR-Injektion erhielten (Abb. 35), ergibt sich unter Betrachtung der bekannten Zellzyklusphasen (siehe Absatz I.), daß die meisten der dann bei Tötung als Mitosen zu beobachtenden Zellen zeitlich etwa am Beginn ihrer DNA-Synthesephase standen. Folglich bedeutet das Ansteigen des MI bei kürzeren radioaktiven Versuchszeiten, eine besondere Erhöhung der Mitosezahl bei ^3H -TdR-Applikation am Ende von S und in G_2 . Für dieses Verhalten lassen sich mehrere Ursachen diskutieren: Möglicherweise kann die β -Strahlung kurzzeitig eine noch stärkere Synchronisation der proliferierenden Hepatocyten auslösen. Noch mehr Zellen beenden gleichzeitig die S-Phase, bzw. durchlaufen kurz vor der Tötung G_2 . Dies erhöht den gesamten Zellfluß in die Mitose und damit die Zahl der beim Beobachtungszeitpunkt gerade in Teilung befindlichen Zellen. Dabei sollte die Bestrahlung eine Abkürzung der Synthesephase oder auch von G_2 bewirken, so daß in dem kurzen Zeitraum zwischen Injektion von ^3H -TdR und Tötung, zusätzliche Zellen in die Mitose eingeschleust werden. Post und Hoffman (1965 a) fanden jedoch bei spät in S ^3H -markierten Zellen einen verzögerten Ablauf von Synthese- und G_2 -Phase, was

aber den obigen Vermutungen absolut entgegenläuft und auf die hier dargestellten Versuche übertragen, keine Zunahme des MI bei kurzen Versuchszeiten verursachen könnte. Vielleicht bewirkt die ^3H -TdR-Injektion auch nur eine systematische Änderung der üblichen individuellen Schwankungen des MI; schon allein dadurch wäre, zumindest über einen kleinen Zeitraum, ein unterschiedlicher MI-Verlauf gegenüber nicht ^3H -TdR-injizierten Tieren möglich.

Eine Entscheidung, ob einer dieser oder andere Mechanismen die bei kurzen Versuchszeiten nach ^3H -TdR-Applikation gegenüber inaktivem TdR oder Hankslösung erhöhten Mitoseaktivitäten auslösen, läßt sich aus den hier durchgeführten Untersuchungen nicht mit Sicherheit fällen. Es ist nicht auszuschließen, daß durch die individuellen Schwankungen der Mitosezahlen MI-Unterschiede zwischen Injektion von ^3H -TdR und von inaktivem TdR nur vorgetäuscht wurden. Es wird erforderlich sein, an größeren Versuchstierserien diese Fragestellung erneut aufzugreifen.

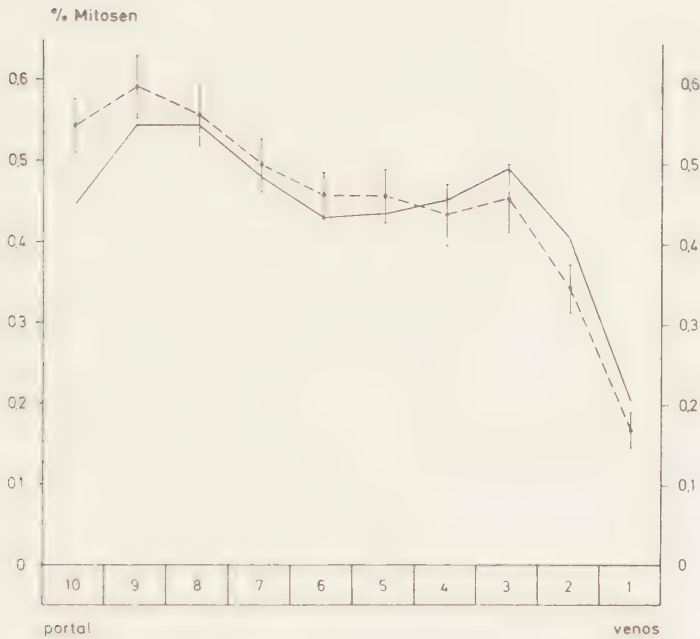


Abb. 51: Mitoseindex der Parenchymzellen in der regenerierenden Leber der Ratte 65 Std. nach Teilhepatektomie (Ordinate) in Abhängigkeit von der Lokalisation der Zellen im Leberlobulus (Abszisse).
-----: MI bei Annahme gleicher Zelldichten in allen 10 Lobuluszonen, Vertikale: mittlerer Fehler des Mittelwertes (Werte von 55 Ratten);
-----: MI bei Berücksichtigung der zonal unterschiedlichen Zelldichte der Hepatocyten im Lobulus.



Abb. 32: Relative Häufigkeit des Eintretens in die Mitose (Ordinate) bei Parenchymzellen der regenerierenden Leber der Ratte 65 Std. nach Teilhepatektomie in Abhängigkeit von der Lokalisation der untersuchten Zellen im Leberlobulus (Abszisse).

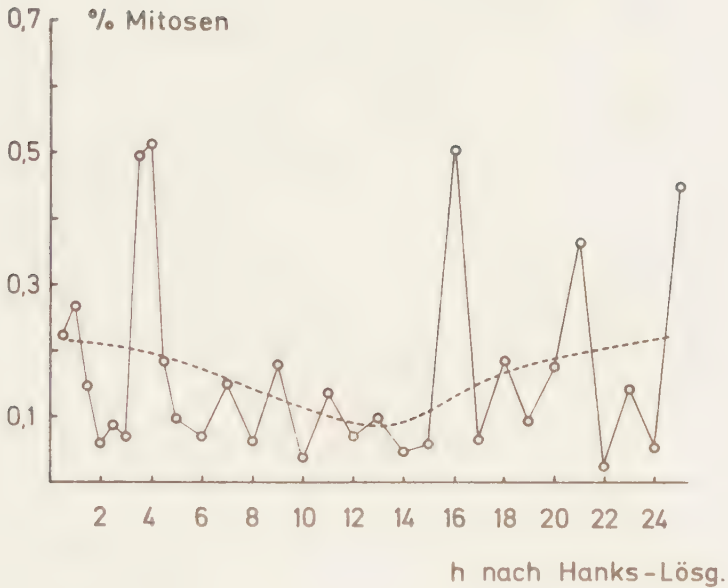


Abb. 33: Mitoseindex der Parenchymzellen in der regenerierenden Leber der Ratte (Ordinate) als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von Hankslösung (0,8 ml) (Abszisse) zu verschiedenen Zeiten nach Teilhepatektomie und Tötung aller Tiere 65 Std. post operationem.
○—○ = MI; ----- = "geglättete" Kurve des MI-Verlaufs (näheres siehe Text).

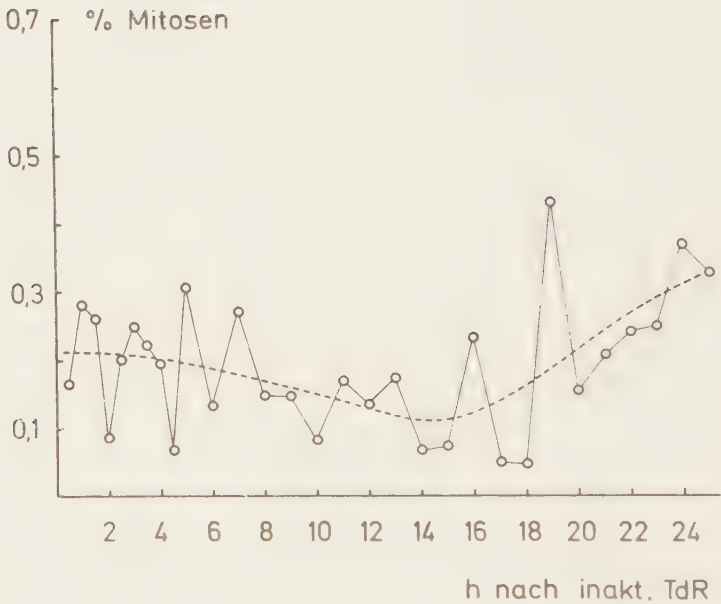


Abb. 34: Mitoseindex der Parenchymzellen in der regenerierenden Leber der Ratte (Ordinate) als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von inaktivem TdR ($7,74 \mu\text{g}$) in Hankslösung ($0,8 \text{ ml}$) (Abszisse) zu verschiedenen Zeiten nach Teilhepatektomie und Tötung der Tiere jeweils 65 Std. post operationem.
○—○ = MI (Mittelwert von je 2 Tieren);
----- = geglättete Kurve des MI-Verlaufs.

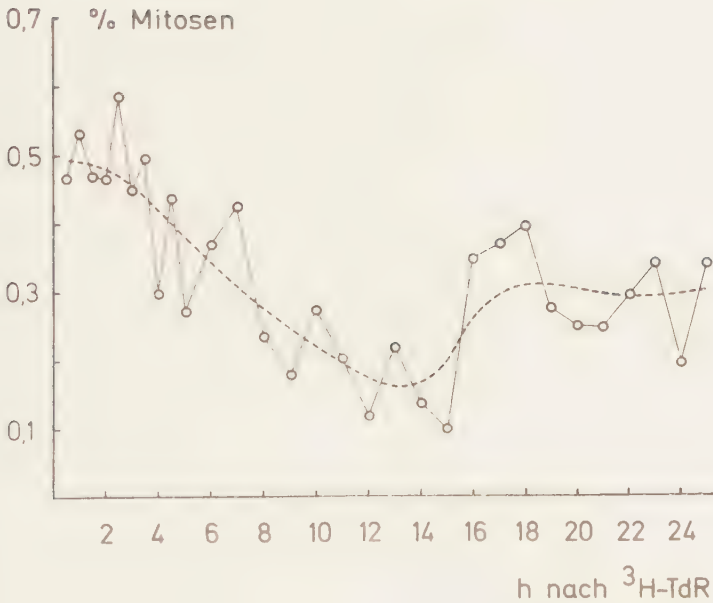


Abb. 35: Mitoseindex der Parenchymzellen in der regenerierenden Leber der Ratte (Ordinate) als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von ^3H -TdR (0,8 $\mu\text{Ci/g}$) (Abszisse) zu verschiedenen Zeiten nach Teilhepatektomie und Tötung aller Tiere jeweils 65 Std. post operationem.
○—○ = MI (Mittelwert von 2 Tieren);
----- = "geglättete" Kurve des MI-Verlaufs.

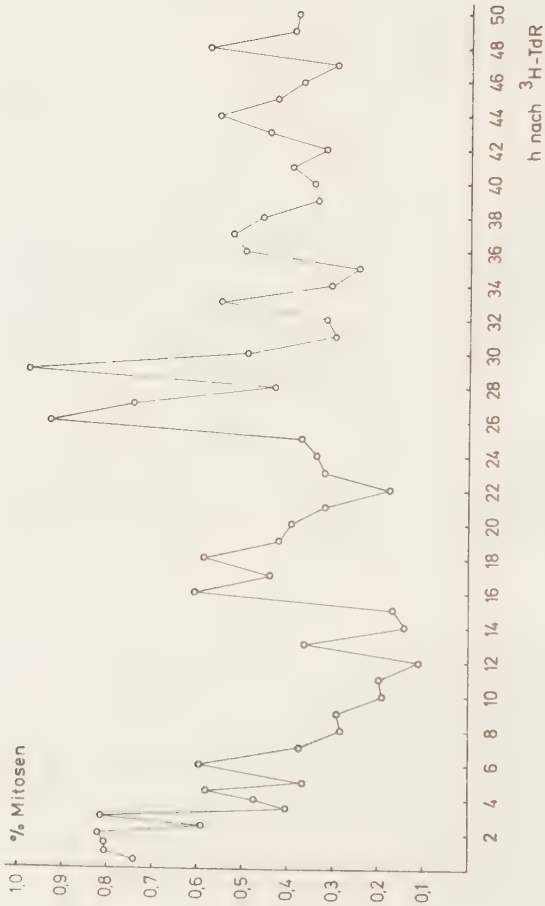


Abb. 35 a: Anordnung wie bei Abb. 35; Mitoseindex (O—O) nur jeweils von einem Tier, dafür aber Injektionen von ^3H -TdR über einen längeren Versuchszeitraum.

% Mitosen

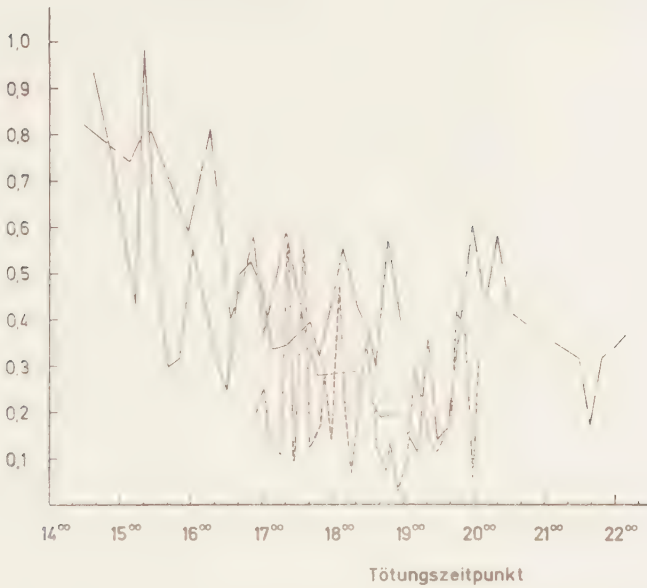


Abb. 36: Mitoseindex der Parenchymzellen in der regenerierenden Leber teilhepatektomierter, zu verschiedenen Zeiten einmalig ^3H -TdR-injizierter Ratten (Ordinate) als Funktion der Tageszeit der jeweils 65 Stunden post operationem erfolgten Tötung (Abszisse).
(Die drei gesonderten Kurven des MI stellen drei an verschiedenen Tagen getötete Versuchstiergruppen dar).

ZONE	Mittelwert ($\bar{x}$) des MI (‰)	mittlerer Fehler ($S \bar{x}$)	Standardab- weichung ($S x$)
10	5,44	$\pm 0,325$	$\pm 2,42$
9	5,92	$\pm 0,383$	$\pm 2,85$
8	5,57	$\pm 0,374$	$\pm 2,78$
7	4,96	$\pm 0,327$	$\pm 2,43$
6	4,58	$\pm 0,291$	$\pm 2,17$
5	4,58	$\pm 0,328$	$\pm 2,44$
4	4,36	$\pm 0,380$	$\pm 2,83$
3	4,57	$\pm 0,421$	$\pm 3,13$
2	3,45	$\pm 0,301$	$\pm 2,25$
1	1,68	$\pm 0,220$	$\pm 1,78$

Tab. 5: Mitoseindex (MI) (Mittelwert in ‰, mittlerer Fehler des Mittelwerts, Standardabweichung) in den 10 Unterabschnitten des Leberlobulus 65 Stunden nach Zweidrittel-Hepatektomie. (Werte von 55 Ratten).

<u>ZONE</u>	<u>Anteil in %</u>
10	12,2
9	10,9
8	10,3
7	10,3
6	10,6
5	10,5
4	9,5
3	9,2
2	8,4
1	8,1

Tab. 6: Relative Zelldichte der Parenchymzellen in den Unterabschnitten des Leberlobulus (65 Std. nach Teilhepatektomie). Prozentualer Anteil der Zellen der einzelnen Zonen an den Zellen aller 10 Zonen des Parenchymstreifens (Länge 426 μ m, Breite 127,8 μ m) zwischen P.S. und T.H.V.

ZUSAMMENFASSUNG

Absatz I

Die Kinetik der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie wird, unter Berücksichtigung der strukturellen Parameter des Leberlobulus, quantitativ bestimmt.

Für Hepatocyten regenerierender Leber der ausgewachsenen Ratte war bei Anwendung des Quastler-Sherman-Verfahrens (Bestimmung der Kurve für die Fraktion markierter Mitosen), ein zweiter Gipfel markierter Mitosen bislang nicht sicher nachzuweisen. Es wird jedoch angenommen, daß zumindest ein Teil der Hepatocyten post operationem mehr als einmal in rascher Folge den Zellzyklus durchläuft. Zur Bestimmung der Zellzyklusparameter wird an der Leber ausgewachsener, etwa 8 Wochen alter, 200 g schwerer männlicher Wistarratten nach Zweidrittel-Hepatektomie die Fraktion markierter Mitosen (FLM) über einen längeren Zeitraum in verschiedenen Intervallen nach einmaliger Injektion von ^3H -Thymidin untersucht. Die Tötung der Tiere erfolgte einheitlich 65 Stunden nach Teilhepatektomie. Die Zeichnung der FLM-Kurven wurde nach einem standardisierten geometrischen Schwerpunktsverfahren vorgenommen.

Im untersuchten Zeitraum von 50 Stunden nach Injektion von ^3H -Thymidin zeigen sich zwei deutliche, weit auseinanderliegende FLM-Maxima. Nach einem Intervall von wenigen Stunden treten die ersten markierten Mitosen auf; es folgt ein steiler, geradliniger Anstieg der Fraktion markierter Mitosen zu einem hohen ersten FLM-Gipfel. Nach einem flacheren Abfall verläuft die Kurve nahe der Abszisse bis zu einer kleinen Vorwelle unmittelbar vor dem zweiten Gipfel. Anstieg und Abfall des zweiten FLM-Maximums sind flach, seine Höhe beträgt nur etwa ein Drittel der des ersten Maximums. Aus der FLM-Kurve werden folgende Zellzyklusparameter abgelesen: $t_S = 7,65 \text{ Std.}$, $t_{M \text{ max}} = 2,18 \text{ Std.}$,

$$t_{G_2 \min} = 3,08 \text{ Std.}, t_{G_1} = 20 \text{ Std.}, t_C = 33 \text{ Std.}$$

Der deutliche zweite FLM-Gipfel beweist, daß ein Teil der Hepatocyten nach der ersten postoperativen Zellteilung eine zweite Mitose durchläuft. Wesentlich für die Limitierung des zweiten FLM-Maximums scheinen die hier gewählte Versuchsanordnung und das spezielle Proliferationsverhalten der Leberzellen nach Hepatektomie zu sein: Zum Zeitpunkt der ^3H -Thymidin-Injektion 15 - 20 Std. nach Teilhepatektomie, entsprechend 50 - 45 Std. vor der Tötung, befinden sich nur relativ wenige Hepatocyten in DNA-Synthese und sind damit durch ^3H -Thymidin markierbar. Folglich ist der relative Anteil markierter Mitosen zum Tötungszeitpunkt gering. Die Gipfelhöhe des zweiten FLM-Maximums hängt somit zum einen ab von der Zahl kurz nach Hepatektomie noch nicht DNA-synthetisierender erst später in die Mitose tretender Zellen; zum anderen von dem Anteil sich post operationem mehrfach teilender Zellen, welche die FLM-Werte entsprechend erhöhen.

Die Geometrie des hohen ersten FLM-Gipfels mit steilem Anstieg und nur wenig flacherem Abfall spricht für geringe Variationen von S, G_2 und M im untersuchten Zellsystem; weitgehendes Fehlen einer Kurvendämpfung auch gegen stärkere Variationen von G_1 . Für die wenigen markierten Mitosen des Mittelabschnitts und der Vorwelle zwischen beiden FLM-Gipfeln werden Variationen der Zellzyklusphasen, Markierung nach Reutilisation von markierten DNA-Vorläufern und der autoradiographische Background erörtert. Flacherer Anstieg und Abfall am zweiten Gipfel machen die mit der Zeit zunehmend deutlicheren Auswirkungen von Phasenvariationen sichtbar.

Die hier gemessenen Zellzyklusparameter weisen die Hepatocyten der regenerierenden Leber als ein schnell proliferierendes Zellsystem aus.

Absatz II

Die für die Gesamtleber ermittelten Zellzyklusparameter gelten nicht gleichermaßen für alle Hepatocyten, sondern ändern sich erheblich je nach deren Lokalisation im Lobulus.

An der regenerierenden Kattenleber wird nach Unterteilung des Leberlobulus in 10 gleich große Abschnitte zwischen Portalfeld und terminalem Ast der vena hepatica für jede dieser Zonen gesondert die Fraktion markierter Mitosen (FLM) nach einmaliger Injektion von ³H-Thymidin untersucht. Dabei grenzt der Abschnitt 1 unmittelbar an den Ast der vena hepatica, der Abschnitt 10 ans Portalfeld. Aus der für jede Zone gesondert gezeichneten FLM-Kurve werden die Zellzyklusparameter abgelesen.

Nach jeweils kurzem Verlauf aller FLM-Kurven für die einzelnen Unterabschnitte des Lobulus auf der Abszisse beginnt ein geradliniger Anstieg der Kurve zuerst in Zone 10 (periportal) und dann kurz nacheinander folgend in den Zonen 9 bis 6. Zwischen den Zonen 5 und 1 (perivenös) werden die Zeitabstände bis zum Kurvenanstieg deutlich größer. Am schnellsten wird das Maximum in Zone 6 erreicht, 9 und 7 bleiben dagegen nur wenig zurück. In Zone 10 und zum terminalen Ast der vena hepatica zu nimmt die Steilheit der Kurve ab. Die FLM-Gipfelplateaus sind portal am breitesten und werden nach venös zu schmaler. Unmittelbar perivenös nimmt auch die Höhe des Plateaus erheblich ab. Die abfallenden Kurvenschenkel werden zur vena hepatica zu flacher. Nach dem ersten Gipfel verlaufen die FLM-Kurven in portalen und intermediären Zonen jeweils sehr nahe der Abszisse; in Zone 2 und 1 fallen sie ganz mit ihr zusammen. Der zweite FLM-Gipfel ist in allen Zonen erheblich niedriger als der erste; mit rund 0,6 ist er in Zone 8 relativ am höchsten, in Zone 9 und 7 liegt er nur wenig niedriger. In Zone 10 und zum Ast der vena hepatica zu,

nimmt die Höhe des zweiten Maximums rasch ab. In Zone 3 und 2 ist ein zweiter Gipfel nur noch angedeutet, in Zone 1 fehlt er ganz.

Am kürzesten ist $t_{G_2 \min}$ in Zone 10 (periportal) mit 2,8 Std.; seine Dauer nimmt langsam bis auf 3,01 Std. in Zone 6 zu, dann rascher bis auf 4,53 Std. in Zone 1. $t_{M \max}$ ist mit 1,49 Std. in Zone 8 am geringsten; es erhöht sich zum Portalfeld bis auf 2,25 Std., bis zu vena hepatica auf 3,17 Std. t_S bleibt in allen Unterabschnitten des Lobulus weitgehend konstant mit Schwankungen zwischen 7,32 und 7,84 Std. Lediglich die Standardabweichung von t_S nimmt zum efferenten Gefäßpol hin deutlich zu. t_C beträgt für die Zone 10 rund 32,5 Std., für Zone 9 31,8 Std. und steigt bis Zone 4 auf 36,6 Std.; in den Zonen 3, 2 und 1 läßt sich t_C nicht mehr messen. Für t_{G_1} ergibt sich daraus ein diskontinuierlicher, nur geringfügiger Anstieg von portalen zu intermediären Zonen.

Die zonalen Gestaltsänderungen des ersten FLM-Maximums sprechen für zunehmende Variationen der Zellzyklusphasen im perivenösen Bereich. Als Ursache der zonal wechselnden Höhe des zweiten FLM-Gipfels sind zu diskutieren:

1. Variabilität von t_C bzw. t_{G_1} zwischen Portalfeld und terminalem Ast der vena hepatica, 2. ein zur vollständigen Erfassung des FLM-Gipfels vor allem venös zu kurzer Versuchszeitraum, 3. die von portal nach venös stark abnehmende Zahl der DNA-synthetisierenden Hepatocyten zu frühen Zeitpunkten nach Zweidrittel-Hepatektomie, 4. der in gleicher Richtung post operationem abnehmende Anteil sich mehrfach teilender Zellen.

Als Ursache der zonal wechselnden zellkinetischen Eigenschaften der Hepatocyten werden die Unterschiede in Nutrition (O_2 -Partialdruck), Enzymaktivität und submikroskopischer Struktur der Hepatocyten in verschiedenen Zonen

zwischen afferentem und efferentem Gefäßpol diskutiert. Weil diese Faktoren keine identischen Veränderungen unterschiedlicher Zellzyklusphasen verursachen, ergibt sich, daß $t_{M \max}$ offenbar mehr von der Blutversorgung, $t_{G_2 \min}$ mehr vom inneren zellulären Milieu abhängig zu sein scheint. Die relative zonale Konstanz von t_S spricht für eine weitgehende Unabhängigkeit der DNA-Synthesephase von Zellstruktur, nutritiver Versorgung und Ploidiestufe der Zelle. Als Ursache für die nur geringfügigen zonalen Änderungen von t_C und t_{G_1} wird insbesondere eine nicht nur zufällige Beziehung der Länge der einzelnen Zellzyklusphasen zueinander und außerdem eine methodische Fehlermöglichkeit bei der t_{G_1} -Messung infolge des portal-venösen Wachstumsdrucks der t_{G_1} regenerierenden Leber diskutiert.

Absatz III

Nach Zweidrittel-Hepatektomie wird die Fraktion markierter Mitosen (FLM) jeweils gesondert für Prophasen, Metaphasen, Anaphasen und Telophasen, ohne Berücksichtigung der Lokalisation der Zellen im Leberlobulus, bestimmt. In gleicher Weise wird mit den jeweils zu einer Einheit zusammengefaßten Zonen 2 und 3 (perivenös), 5 und 6 (intermediär), 8 und 9 (periportal) und der Zone 10 (unmittelbar periportal) das Verhalten innerhalb des Lobulus untersucht. Für die Gesamtleber wie für die einzelnen Teilbereiche, ergeben sich je 4 zeitlich gegeneinander versetzte FLM-Kurven der Mitoseteilphasen.

Die ansteigenden Kurvenschenkel der FLM-Kurven der Gesamtleber wie von den 4 getrennt ausgewerteten Lobulusbereichen verlaufen annähernd parallel, am deutlichsten periportal, etwas divergent dagegen perivenös. Gegenüber dem steilsten Anstieg in den Zonen 8 + 9 werden die Anstiege

in den Bereichen 10 und 5 + 6 zunehmend, in 2 + 3 sogar erheblich flacher. Die Steigungen bei der Kurve der Gesamtleber nehmen eine Mittelstellung ein. Die bei den ersten Versuchszeitpunkten noch streng geordnete größenmäßige Folge der Kurven für Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen wird mit zunehmender Versuchsdauer mehr und mehr verwischt.

Bei dem geeignetsten Meßpunkt, $FLM = 0,5$ am ansteigenden Kurvenschenkel, werden die Abstände zwischen den einzelnen FLM-Kurven abgelesen. Das mit gewissen Einschränkungen als Maß für $t_{M \text{ mittel}}$ verwendbare Prophasen-Telophasen-Intervall beträgt für den Gesamtlobulus 51,1 min, für Zone 10 = 57,0 min, für die Zonen 8 + 9 = 40,0 min, für die Zonen 5 + 6 = 57,6 min und für die Zonen 2 + 3 = 81,2 min. Unterabschnitte der Mitose, wie die Zeitabstände zwischen den FLM-Kurven der 4 Teilphasen (Pro- zu Meta-, Meta- zu Ana- und Ana- zu Telophasen), sind in der Relation zueinander zonal wie $t_{M \text{ mittel}}$ geordnet. Diese Intervalle zwischen den FLM-Kurven zweier aufeinanderfolgender Mitosestadien (z.B. Meta- zu Anaphasen) können nicht unmittelbar als zeitliches Maß für die Dauer der betreffenden Teilphase verwendet werden. Die mit der angegebenen Methode bestimmte mittlere Mitosedauer ist bei der Gesamtleber wie in jedem Lobulusbereich jeweils erheblich kürzer als die für den gleichen Bereich berechnete maximale Mitosedauer.

Wie $t_{M \text{ max}}$ sind auch $t_{M \text{ mittel}}$ und die Zeitintervalle zwischen den FLM-Kurven der einzelnen Mitosestadien keine für alle Hepatocyten zutreffenden Werte, sondern in Abhängigkeit von der Lokalisation des einzelnen Hepatocyten unterschiedlich lang und dabei zwischen Portalfeld und terminalem Ast der vena hepatica systematisch geordnet. Die hier aus dem Prophasen- Telophasen-Abstand für die Gesamtleber ermittelte mittlere Mitosedauer ist gut mit den Werten für gleich alte Tiere aus anderen Untersuchungen zu vergleichen.

Als Ursache der zonalen Unterschiede von t_M mittel wie auch der Dauer von Unterabschnitten der Mitose sind die gleichen Faktoren zu diskutieren, die in Absatz II angeführt wurden.

Absatz IV

Für die quantitative Bestimmung der Zellzyklusparameter mit der FLM-Methode hat die Standardisierung der Auswertungstechnik, insbesondere die Berücksichtigung des autoradiographischen Background und die Quantifizierung der Silberkorndichte über den mitotischen Zellen große Bedeutung.

An der regenerierenden Leber der Ratte wird die Silberkorndichte des Background nach einer einmaligen Injektion von ^3H -Thymidin in verschiedenen Intervallen bestimmt und für die weiteren Untersuchungen als Maß verwendet. Die Geometrie der FLM-Kurven und damit auch die Dauer der abzulesenden Zellzyklusabschnitte sind von der Silberkorndichte der als markiert gewerteten Mitosen abhängig.

Der im vorliegenden Untersuchungsmaterial insgesamt sehr niedrige autoradiographische Background hat die höchste Silberkornzahl pro Flächeneinheit unmittelbar nach der ^3H -Thymidin-Injektion. Nach sehr raschem Abfall bleiben schon ab 1,5 Std. die Werte bis zum Ende der Versuchszeit etwa konstant um 3,6 Silberkörner pro $1000 \mu\text{m}^2$. Für den zu Beginn hohen, schon nach wenigen Stunden dann jedoch stark verringerten, in der Höhe gleichbleibenden Background wird eine sofort nach Injektion hohe, dann im Laufe der Verfügbarkeitszeit des ^3H -Thymidin sehr rasch reduzierte Konzentration ungebundener ^3H -Aktivität im Kreislauf und Gewebe diskutiert.

Die als Markierungskriterium (Markierungsschwelle) festge-

setzte Silberkorndichte von 1 bis 15 Silberkörnern pro Mitose ergibt verschiedene FLM-Kurven. Sie zeigen mit steigender Markierungsschwelle einen zunehmend schmalen und niedrigeren ersten Gipfel bei jeweils parallel verschobenen Kurvenschenkeln. Bei Festlegung der Markierungsschwelle bei 1 Silberkorn zeigt die Kurve außer dem geringen Abfall nach dem ersten FLM-Gipfel keine wesentliche Absenkung. Sie verläuft bis zum Versuchsende weit über der Abszisse. Schon bei einer Markierungsschwelle von 2 Silberkörnern sinkt der mittlere Abschnitt der FLM-Kurve ab. Ebenso wird das zweite Maximum erkennbar und ist bei einer Markierungsschwelle von 3 Silberkörnern nach einem längeren abszissennahen Verlauf der FLM-Kurve gegen Ende des Versuchszeitraumes bereits deutlich sichtbar. Zugleich nimmt die Höhe dieses zweiten Gipfels mit der Erhöhung der Markierungsschwelle schrittweise ab.

Die aus den einzelnen FLM-Kurven nacheinander abzulesenden Zellzyklusparameter zeigen bei einer Markierungsschwelle von 1 Silberkorn ein t_S von rund 9,5 Std. Mit zunehmender Erhöhung der Markierungsschwelle sinkt t_S gleichmäßig bis auf 6,6 Std. für eine Markierungsschwelle von 15 Silberkörnern. $t_{G_2 \text{ min}}$ nimmt mit ansteigender Markierungsschwelle insgesamt von 2,70 Std. langsam und nicht ganz kontinuierlich auf 3,28 Std. zu. Mit Ausnahme von 2,43 Std., die einer Markierungsschwelle von 1 Silberkorn zugrundeliegen, bleibt $t_{M \text{ max}}$ zwischen Markierungsschwellen von 2 bis 15 Silberkörnern weitgehend konstant bei Werten um 2,18 Std. Bei allen FLM-Kurven, die aufgrund ihres Verlaufs eine Messung von t_C erlauben, ergibt sich ein Wert von 33 Std. t_{G_1} nimmt mit steigender Markierungsschwelle geringfügig von 18,9 auf 20,9 Std. zu.

Der hohe Anteil sehr schwach markierter Mitosen vor dem ersten FLM-Maximum wird durch den in diesem Zeitabschnitt hohen autoradiographischen Background verursacht. Als Grund für die mit Erhöhung der als Markierungskriterium

gewählten Silberkornzahl (Markierungsschwelle) besonders starke Verkürzung des t_S -Intervalls ist zu diskutieren:

1. eine Verlängerung der Markierungsphase um die Zeit der ^3H -Thymidin-Verfügbarkeit im Organismus, die vor allem bei den niedrigen Markierungsschwellen von Bedeutung ist;
2. eine bei den Hepatocyten nicht konstante, sondern zu Beginn von S ansteigende DNA-Syntheserate. Die größtenteils schwach markierten Mitosen zwischen erstem und zweitem FLM-Gipfel dürften vornehmlich durch Reutilisation von DNA-Kataboliten entstanden sein. Daneben wird für sie eine Markierung durch Background-Effekte, ein über die normale Verfügbarkeitszeit hinaus bestehender ^3H -Thymidin-Pool, metabolische DNA-Synthese und das Vorkommen einzelner Zellen mit deutlich abweichenden Zellzyklusphasen diskutiert. Die gegenüber dem ersten FLM-Gipfel mit steigender Markierungsschwelle erkennbare Verringerung des zweiten Gipfels spricht für eine dort erheblich größere Zahl schwächer markierter Mitosen als beim ersten FLM-Gipfel, wohl als Folge einer Halbierung der Silberkornzahl bei der Zellteilung.

Bei Erhöhung der als Markierungskriterium festgelegten Silberkornzahl (Markierungsschwelle) bleibt der FLM-Kurvenverlauf für eine bestimmte Lobuluszone zwischen Portalfeld und terminalem Ast der vena hepatica im Prinzip immer gleich. Zwischen Markierungsschwellen von 3, 5, 8 und 15 Silberkörnern wechselt die Kurvenform dabei schrittweise wie bei den FLM-Kurven der Gesamtleber: jeweils der erste und zweite Gipfel werden schmaler und niedriger, der FLM-Mittelabschnitt tiefer. Unabhängig von der gewählten Markierungsschwelle zeigen die Zellzyklusparameter immer ein gleichbleibendes zonales Verhalten. Lediglich die absoluten Phasendauern ändern sich für jeden einzelnen Unterabschnitt des Lobulus mit der Markierungsschwelle, gleichartig wie bei den FLM-Kurven für die Gesamtleber.

Als Ursache der zonal unterschiedlichen Reduzierung der FLM-Gipfel bei Erhöhung der Markierungsschwelle wird eine innerhalb des Lobulus unterschiedliche ^3H -Thymidin-Verfügbarkeit diskutiert.

Die für die Markierungsschwelle von 3 Silberkörnern erstellten FLM-Kurven der Mitoseteilphasen von drei verschiedenen Lobulusbereichen zeigen, daß bei niedriger Markierungsschwelle die Kurven höher und breiter werden, das zonale Verhalten aber immer gleich bleibt. Wie $t_{M \max}$ sind auch $t_{M \text{ mittel}}$ und kleinere Unterabschnitte der Mitose in ihrer Dauer von der jeweils gewählten Markierungsschwelle weitgehend unabhängig.

Weil also selbst an ein und dem selben Zellsystem je nach Wahl der Markierungsschwelle für die Konstruktion der FLM-Kurven erheblich unterschiedliche Zellzyklusphasen gemessen werden, sind bei vergleichenden Untersuchungen möglichst ähnliche Auswertungskriterien anzustreben.

Die Notwendigkeit eines weitgehend objektivierten und reproduzierbaren Zeichenverfahrens bei der Auswertung von FLM-Kurven wird besprochen und geeignete Verfahren zum Ablesen der Zellzyklusphasen aus der FLM-Kurve, dabei besonders von $t_{G_2 \text{ min}}$, werden diskutiert.

Absatz V

Das Quastler-Sherman-Verfahren kann in seiner Aussagefähigkeit durch Mitose-Rhythmen beeinträchtigt werden. Es wird daher beabsichtigt, versuchsbedingte rhythmische Prozesse in der Mitoseaktivität an dem untersuchten Modell quantitativ zu erfassen.

An der Leber der Ratte wird die Mitoseaktivität 65 Std. nach Zweidrittel-Hepatektomie bestimmt: 1. in Abhängigkeit

von der Lokalisation der Zellen im Leberlobulus, 2. zu verschiedenen Zeitpunkten nach einmaliger Injektion von Hankslösung, 3. inaktivem Thymidin und 4. ^3H -Thymidin, sowie 5. in Abhängigkeit von dem jeweiligen Tötungszeitpunkt des Tieres.

Das Mitose-Maximum von 0,8 % liegt 65 Std. nach Teilhepatektomie portal in Zone 9; von hier sinken die Werte zum terminalen Ast der vena hepatica langsam ab bis zu einem zweiten kleineren Gipfel in Zone 3. Auch die periportale Zone 10 bleibt deutlich hinter den Höchstwerten zurück. Unmittelbar perivenös (Zone 1) fällt die Mitosezahl bis auf 0,2 %. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Mitosedauer in den Unterabschnitten des Lobulus ergibt sich daraus, daß der Zellfluß in die Mitose portal sein Maximum zeigt, intermediär und perivenös auf weniger als die Hälfte absinkt und in der periportal Zone 10 ebenfalls gegenüber Zone 9 reduziert ist.

Injektion von Hankslösung und inaktivem TdR führt zu weitgehend gleichen Veränderungen des Mitoseindex: kurz nach Versuchsbeginn fällt der Mitoseindex langsam bis zu einem zeitlich in beiden Versuchsansätzen gleichgelagerten Minimum, an das sich ein mäßig steiler Wiederanstieg anschließt. Dagegen sind in den ersten Stunden nach Injektion von radioaktiv markiertem, tritiiertem Thymidin die Mitosen etwa doppelt so zahlreich wie nach Injektion von Hankslösung oder inaktivem Thymidin in Hankslösung. Mit zunehmender Versuchszeit nimmt diese initiale Erhöhung des Mitoseindex nach ^3H -Thymidin-Injektion rasch ab. Ab dem zeitlich etwa gleich gelegenen Minimum ist kein charakteristischer Unterschied im Verhalten des Mitoseindex zwischen den Versuchsgruppen mehr zu erkennen.

Zur Erfassung der circadianen Rhythmik des Mitoseindex wurden die Werte den entsprechenden Tageszeiten zugeordnet. Die Reihung nach dem Tötungszeitpunkt der Tiere zeigt, daß

die meisten Zellteilungen um 15 Uhr, zu Beginn des hier erfaßten Zeitbereichs ablaufen, dann einen raschen Abfall auf etwa ein Drittel bei 19 Uhr bis 19.30 Uhr aufweisen, dem sich ab 20 Uhr ein geringer Wiederanstieg anschließt.

Für die Mitoseverteilung im Lobulus zwischen Portalfeld und terminalem Ast der vena hepatica 65 Std. nach Teilhepatektomie werden die ähnlich verlaufende zweite postoperative DNA-Synthesewelle, für venöse Zonen die letzten Anteile der ersten DNA-Synthesewelle in diesem Bereich verantwortlich gemacht. Die zonalen Änderungen des Mitoseindex entsprechen dem zeitlich zugehörigen Verhalten der vorangehenden DNA-Synthesewelle.

Die selektive Betrachtung des Mitoseindex gestattet keine näheren Angaben über den Zellfluß in die Mitose. Erst bei Einbeziehung der unterschiedlichen Mitosedauern ist dessen zonales Verhalten exakt zu beurteilen.

Die bereits in diesem kurzen Teilausschnitt sichtbar gewordene Tagesrhythmik der Leberzellproliferation wird als Hauptursache des wellenförmigen Verlaufs des Mitoseindex nach Injektion von Mankslösung und inaktivem Thymidin angesehen. Für die transitorische, initiale Akkumulierung von Mitosen nach Injektion von tritiiertem Thymidin werden radiotoxische Wirkungen diskutiert.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ALPEN, E. L., JOHNSTON, M. E.: DNA-synthetic rate and DNA-content of nucleated erythroid cells. *Exp. Cell Res.* 47, 177-192 (1967).
- ALTMANN, H.-W.: Der Zellersatz, insbesondere an den parenchymatösen Organen. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 50, 15-51 (1966).
- AMES, I. H., and MITRA, J.: An effect of exogenous thymidine on the cell cycle in *haplopappus gracilis*. *J. Cell Physiol.* 69, 253-258 (1967).
- ANDREW, W., H. M. BROWN and J. B. JOHNSON: Senile changes in the liver of mouse and man, with special reference to the similarity of the nuclear alterations. *Amer. J. Anat.* 72, 199-221 (1943).
- BADE, E. G. and J. M. ECHAVE LLANOS: Variation in the mitotic activity of the liver during the second day of posthepatectomy regeneration. *Naturwiss.* 50, 693-694 (1963).
- BARRET, J. C.: A mathematical model of the mitotic cycle and its application to the interpretation of percentage labeled mitoses data. *J. Nat. Cancer Inst.* 37, 443-450 (1966).
- BECKER, F. F., and B. P. LANE: Regeneration of the mammalian liver IV. Evidence on the role of cytoplasmic alterations in preparation for mitosis. *Amer. J. Path.* 49, 227-258 (1966).
- BERTALANFFY, F. D.: Cell renewal in the gastrointestinal tract of man. *Gastroenterology* 43, 472-475 (1962).
- BIZZOZERO, G.: Wachstum und Regeneration im Organismus. *Wien. med. Wschr.* 44, 697-699 und 744-747 (1894).
- BOLLUM, F. J., and V. R. POTTER: Nucleic acid metabolism in regenerating rat liver. VI. Soluble enzymes which convert thymidine to thymidine phosphates and DNA. *Cancer Res.* 19, 561-565 (1959).
- BROCKWELL, P. J., E. TRUCCO, and R.J.M. FRY: The determination of cell cycle parameters from measurements of the fraction of labeled mitoses. *The Bulletin of Mathematical Biophysics* 34, 1-12 (1972).

- BRUES, A. M., and E. E. MARBLE: An analysis of mitosis in liver restoration. *J. exp. Med.* 65, 15-27 (1937).
- BRYANT, B. I.: Reutilization of leucocyte DNA by cells of regenerating liver. *Exp. Cell Res.* 27, 70-79 (1962).
- BRYANT, B. J.: In vivo reutilization of the DNA-thymidine of necrotized liver cells by cells of testis and intestine. *Exp. Cell Res.* 32, 209-212 (1963 a).
- BRYANT, B. J.: Reutilization of lymphocyte DNA by cells of intestinal crypts and regenerating liver. *J. Cell Biol.* 18, 515-523 (1963 b).
- BRYANT, B. J.: The delayed uptake of H-3-thymidine by Ehrlich ascites tumor cells. *Exp. Cell Res.* 37, 490-494 (1965).
- BUCHER, N.L.R.: Regeneration of mammalian liver. *Int. Rev. Cytol.* 15, 245-300 (1963).
- BUCHER, N.L.R.: Experimental aspects of hepatic regeneration. *New Eng. J. Med.* 277, 686-696, 738-746 (1967).
- BUCHER, N.L.R., and M. N. SWAFFIELD: The rate of incorporation of labeled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised. *Cancer Res.* 24, 1611-1625 (1964).
- BUCHER, N.L.R., M. N. SWAFFIELD, and J.F. DI TROIA: The influence of age upon the incorporation of thymidine-2-C¹⁴ into the DNA of regenerating rat liver. *Cancer Res.* 24, 509-512 (1964).
- BÜCHNER, F., M. H. HARA: Der DNS-Stoffwechsel von *Triturus helveticus*-Keimen in der Frühentwicklung und seine Störung durch temporäre Atmungshemmung (nach histoautoradiographischen Untersuchungen). *Beitr. path. Anat.* 134, 166-215 (1966).
- BULLOUGH, W. S.: Stress and epidermal mitotic activity I. The effect of the adrenal hormones. *J. Endocrinol.* 8, 265-274 (1952).
- BULLOUGH, W. S.: Mitotic and functional homeostasis: A speculative review. *Cancer Res.* 25, 1683-1727 (1965).
- van CANTFORT, J. J., BARBASON, H. R.: Relation between the circadian rhythms of mitotic rate and cholesterol-7 α -hydroxylase activity in the regenerating liver. *Cell Tissue Kinet.* 5, 325-330 (1972).

- CASTRUP, H. I., LENNARTZ, K. I.: Änderung der Zellkinetik des Oberflächenepithels des Magens bei Urämie. Autoradiographische Untersuchung mit der Prozent-markierte-Mitosen-Methode.
Beitr. Path. 146, 315-321 (1972).
- CATER, D. B., B. E. HOLMES, and L. K. MEE: Cell division and nucleic acid synthesis in the regenerating liver of the rat.
Acta radiol. 46, 655-667 (1956).
- CHANG, L. O., and LOONEY, W. B.: A biochemical and autoradiographic study of the in vivo utilization of tritiated thymidine in regenerating rat liver.
Cancer Res. 25, 1817-1822 (1965).
- CLEAVER, J. E., and R. M. HOLFORD: Investigations into the incorporation of H-3-thymidine into DNA in L-strain cells and the formation of a pool of phosphorylated derivatives during pulse labelling.
Biochem. Biophys. Acta 103, 654-671 (1965).
- COWDRY, E. V.: Problems of aging.
Williams and Wilkins, Baltimore (1942).
- COWDRY, E. V.: Cells and their behaviour.
In: Pathology, Anderson, St. Louis: Mosby Comp. (1953).
- DIDERHOLM, H., K. E. FICHTELIUS, and O. LINDER: Availability time of 3-H-label after administration of 3-H-thymidine in vivo.
Exp. Cell Res. 27, 431-435 (1962).
- DÖRMER, P., W. SCHMOLKE, P. MUSCHALIK und W. BRINKMANN:
Die DNS-Synthesegeschwindigkeit im Verlaufe der DNS-Synthesephase von Erythroblasten der Maus in vivo.
Beitr. Path. 141, 174-186 (1970).
- EDER, M., R. JOSTEN und H. WRBA: Autoradiographische Untersuchungen zur Topik der Leberregeneration nach Teilhepatektomie und akuter Thioacetamidvergiftung.
Naturwiss. 52, 211-212 (1965).

- EDWARDS, J. L., and A. KOCH: Parenchymal and littoral cell proliferation during liver regeneration. Lab. Invest. 15, 32-43 (1964).
- EVANS, H. J., NEARY, G. J., and S. M. TONKINSON: The use of colchicine as an indicator of the mitotic rate in broad bean root meristems. J. Genet. 55, 487 (1957).
- FABRIKANT, J. I.: The effect of prior continuous irradiation on the G₂, M, and S-phases of proliferating parenchymal cells in the regenerating liver. Radiation Res. 31, 304-314 (1967 a).
- FABRIKANT, J. I.: Kinetic Analysis of Hepatic Regeneration. Growth 31, 311-315 (1967 b).
- FABRIKANT, J. I.: The spatial distribution of parenchymal cell proliferation during regeneration of the liver. The John Hopkins Medical Journal, Vol. 120, No. 3, 137-147 (1967 c).
- FABRIKANT, J. I.: Cell proliferation in the regenerating liver and the effect of prior continuous irradiation. Radiation Res. 32, 804-826 (1967 d).
- FABRIKANT, J. I.: The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. J. Cell Biol. 36, 551-565 (1968).
- FABRIKANT, J. I.: Radiation response in relation to the cell cycle in vivo. The American Journal of Roentgenology, Radium Therapy and Nuclear Medicine Vol. 105, No. 4, 734-745 (1969).
- FABRIKANT, J. I.: Size of proliferating pools in regenerating liver. Exp. Cell Res. 55, 277-279 (1969 b).
- FEINENDEGEN, L. E., BOND, V. P., CRONKITE, E. P., and HUGHES, W. L.: Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Hemat., Lissabon (1963). S. Karger, Basel, New York (1963).
- FEINENDEGEN, L. E., BOND, V. P., and HUGHES, W. L.: Physiological thymidine reutilization in rat bone marrow. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122, 448-455 (1966).
- FERDINANDUS, J. A., H. P. MORRIS, G. WEBER: Behavior of opposing pathways of thymidine utilization in differentiating, regenerating, and neoplastic liver. Cancer Res. 31, 550-556 (1971).
- FICHTELIUS, K. E., O. GROTH: Re-utilization of deoxyribonucleic acid from cells other than leucocytes. Nature 200, 587-588 (1963).

- FRISDAIN, M., TILSON, D., and D. ROBERTS: Studies of deoxyribonucleic acid biosynthesis in embryotic tissues with thymidine-C-14.
J. biol. Chem. 220, 627-637 (1956).
- FRY, R.J.M., LESHER, S., and KOHN, H. I.: A method for determining mitotic time.
Exp. Cell Res. 25, 469-471 (1961).
- FRY, R.J.M., S. LESHER, W. E. KISIELESKI, and G. SACHER: Cell proliferation in the small intestine.
In: Cell Proliferation, ed: Lamerton, L.F., and Fry, R.J.M. Blackwell Sci. Publ., Oxford 215-233 (1965).
- GELFANT, S.: Initiation of mitosis in relation to the cell division cycle.
Expr. Cell Res. 26, 395-405 (1962).
- GELFANT, S.: Patterns of epidermal division. I. Genetic behavior of the G₁-cell population.
Exp. Cell Res. 32, 521-526 (1965).
- GERECKE, D.: An improved method for the evaluation of DNA-synthesis time from the graph of labeled mitoses.
Exp. Cell Res. 62, 467-489 (1970).
- GILBERT, W.: The labeled mitoses curve and the estimation of the parameters of the cell cycle.
Cell Tissue Kinet. 5, 53-65 (1972).
- GREULICH, R. C., I. L. CAMERON, and J. D. THRASHER: Stimulation of mitosis in adult mice by administration of thymidine. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 47, 745-748 (1961).
- GRISHAM, J. W.: Deoxyribose nucleic acid synthesis and cell renewal in regenerating rat liver.
J. Histochem. Cytochem. 8, 350 (1960).
- GRISHAM, J. W.: Inhibitory effect of tritiated thymidine on regeneration of the liver in the young rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 105, 555-558 (1960 b).
- GRISHAM, J. W.: A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with Thymidine-H-3.
Cancer Res. 22, 842-849 (1962).
- GRISHAM, J.W.: Cellular proliferation in the liver. In: Normal and malignant cell growth, page 28-45, ed: Fry, R.J.M., Griem, M. L., and Kirsten W. H. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1966).

- GRUNDMANN, E.: Der mitotische Zellzyklus.
In: Handb. d. allg. Pathol., Bd. II/2, 282-479
Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1971).
- GRUNDMANN, E., und G. BACH: Amitosen, Endomitosen und Mitosen nach partieller Hepatektomie.
Beitr. path. Anat. 123, 144-172 (1960).
- GRUNDMANN, E., und H. J. SEIDEL: Die reparative Parenchymregeneration am Beispiel der Leber nach Teilhepatektomie.
In: Handb. d. allg. Pathol. VI/2, 129-243
Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1969).
- GÜNTHER, G., K. HÜBNER, und A. PAUL: Mitose-Rhythmen der Leber nach Teilhepatektomie.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 1, 69-79 (1968).
- HARKNESS, R. D.: The spatial distribution of dividing cells of the rat after partial hepatectomy.
J. Physiol. 116, 373-379 (1952).
- HARRIS, E. B., and D. HOELZER: DNA synthesis time in leukaemic cells as measured by the double labelling and the percentage labeled mitoses methods.
Cell Tissue Kinet. 4, 433-441 (1971).
- HEINE, W.-D., M. E. STÖCKER: Zum Proliferationsmodus der Rattenleber nach modifizierter Teilhepatektomie. Autoradiographische Untersuchungen mit 3-H-Thymidin.
Klin. Wschr. 46, 395-396 (1968 a).
- HEINE, W.-D., und E. STÖCKER: Autoradiographische Untersuchungen zum Proliferationsmodus der Leber alter Ratten.
Acta histochem. Suppl. 8, 305-314 (1968 b).
- HEINE, W.-D., STÖCKER, E.: Der Proliferationsmodus der Leber seniler Ratten nach Teilhepatektomie.
Verh. dtsh. Ges. Path. 54, 550-554 (1970).
- HEININGER, H. J., G. FRIEDRICH, L. E. FEINENDEGEN, F. CANTELMO: Reutilization of 5-125-I-Iodo-2'-Deoxyuridine and 3-H-Thymidine in regenerating liver of mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 137, 1381-1384 (1971).
- HELPAP, B., und H. CREMER: Zellkinetische Untersuchungen zur Wundheilung der Mäuseleber.
Virchows Arch. Abt. B. Zellpath. 10, 134-144 (1972).
- HELPAP, B., H. CREMER, und V. GROULS: Reutilisation von markierten DNS-Bausteinen bei der Wundheilung.
Naturwiss. 58, 574-575 (1971).

- HIGGINS, G. M., and ANDERSON, R. M.: Experimental pathology of the liver; restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch. Pathol. 12, 186-202 (1931).
- HILL, M., and DRASIL, V.: Nuclear uptake of DNA fragments after injection of ^{32}P -labelled thymocytes in lethally irradiated mice. Exp. Cell Res. 21, 569-582 (1960).
- HILSCHER, B., W. HILSCHER, G. DELBRUCK, und B. LEROUGE-BENARD: Autoradiographische Bestimmung der S-Phasen-Dauer der Genozyten bei der Wistar-Ratte durch Einfach- und Doppelmarkierung. Z. Zellforsch. 125, 229-251 (1972).
- HILSCHER, B., W. HILSCHER, und W. MAURER: Autoradiographische Bestimmung der Generationszeiten und Teilphasen der verschiedenen Spermatogonien-Generationen der Ratte. Naturwiss. 53, 415-416 (1966).
- HINRICHS, H. R., R. O. PETERSEN, and R. BASERGA: Incorporation of thymidine into DNA of mouse organs. Arch. Path. 78, 245-253 (1964).
- HOOVER, C.E.S.: Use of colchicine for the measurement of mitotic rate in intestinal epithelium. Amer. J. Anat. 108, 231-244 (1961).
- HOWARD, A., and S. R. PELC: Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity, Suppl. 6, 261-273 (1953).
- HUGHES, W. L., V. P. BOND, G. BRECHER, E. P. CRONKITE, R. B. PAINTER, H. QUASTLER, and F. G. SHERMAN: Cellular proliferation in the mouse as revealed by autoradiography with tritiated thymidine. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 44, 476-483 (1958).
- IZQUIERDO, J. N., and S. J. GIBBS: Circadian rhythms of DNA-synthesis and mitotic activity in hamster cheek pouch epithelium. Exp. Cell Res. 71, 402-408 (1972).
- JAFFE, J. J.: Diurnal mitotic periodicity in regenerating rat liver. Anat. Rec. 120, 935-954 (1954).
- KILLANDER, D. and A. ZETTERBERG: Quantitative cytochemical studies on the interphase growth I. Exp. Cell Res. 38, 272-284 (1965).
- KLINGE, O.: Altersabhängige Beeinträchtigung der Zellvermehrung in der regenerierenden Rattenleber. Virchows Arch. Abt. B. Zellpath. 1, 342-345 (1968).

- KLINGE, O., und MATHYL, J.: Tageszeitliche Mitose-Rhythmen in der teilhepatektomierten Rattenleber.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 2, 154-162 (1969).
- KOBURG, E.: The use of grain counts in the study of cell proliferation. In: Cell Proliferation, ed.: Lamerton, L. F., and Fry, R.J.M. Blackwell Sci. Publ., Oxford, 62-76 (1963).
- KOBURG, E., und W. MAURER: Autoradiographische Untersuchung mit 3-H-Thymidin über die Dauer der Desoxyribonukleinsäure-Synthese und ihren zeitlichen Verlauf bei den Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus.
Biochem. Biophys. Acta (Amst.) 61, 229-242 (1962).
- KOPRIWA, B. M., and C. P. LEBLOND: Improvements in the coating technique of radioautography.
J. Histochem. Cytochem. 10, 269-284 (1962).
- LAJTHA, L. G., OLIVER, R., and GURNEY, C. W.: Kinetic model of a bone-marrow stem-cell population.
Brit. J. Haematol. 8, 442-460 (1962).
- LALA, P. K.: Studies on tumor cell population kinetics. In: Methods in Cancer Res., Vol. 6, ed: H. Busch Academic Press, New York, London 3-95 (1971).
- LANG, W., D. MÜLLER, W. MAURER: Prozentuale Beteiligung von exogenem Thymidin an der Synthese von DNS-Thymidin in Geweben der Maus und in HeLa-Zellen.
Exp. Cell Res. 49, 558-571 (1968).
- LANG, W., Ch. PILGRIM, und W. MAURER: Prozentualer Anteil von 3-H- oder 14-C-Thymidin an der DNS-Synthese von Zellarten der Maus. Naturwiss. 53, 210 (1966).
- LEBLOND, C. P., C. E. STEVENS: The constant of the intestinal epithelium in the albino rat.
Anat. Rec. 100, 357-378 (1948).
- LEDUC, E. H.: Mitotic activity in the liver of the mouse during irradiation followed by refeeding with different levels of protein.
Amer. J. Anat. 84, 397-430 (1949).
- LESHER, S., R.J.M. FRY, and G. A. SACHER: Effects of chronic gamma irradiation on the generation cycle of the mouse duodenum. Exp. Cell Res. 25, 398-404 (1961).
- LINDSAY-GIBSON, M. H., and F. D. BERTALANFFY: The in vivo cell kinetics of transplantable B16 mouse melanoma. Growth 36, 263-274 (1972).

- LIPKIN, M.: The proliferative cycle of mammalian cells.
In: The Cell Cycle and Cancer, Vol. 1, ed.: R. Baserga
In: The Biochemistry of Disease, ed: E. Farber
M. Dekker Inc., New York 1-26 (1971).
- LOONEY, W. B.: The replication of deoxyribonucleic acid
in hepatocytes.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 46, 690-708 (1960).
- LOONEY, W. B., CHANG, L. O., BANGHART, F. W.: The rate of
DNA replication at the molecular, chromosomal, cellular,
and intracellular levels in regenerating rat liver.
Proc. nat. Acad. Sci. 57, 972-978 (1967).
- LOPEZ-SAEZ, J. F., GIMENEZ-MARTIN, G., GONZALES-FERNANDEZ,
A.: Duration of the cell division cycle and its dependence
on temperature.
Z. Zellforsch. 75, 591-600 (1966).
- LORD, B. I.: The effects of continuous irradiation on cell
proliferation in rat bone marrow.
Brit. J. Haem. 10, 496-507 (1964).
- LOUD, A. V.: Description of the ultrastructure of normal
rat liver parenchymal cells.
J. Cell Biol. 37, 27-46 (1968).
- MALONEY, M. A., PATT, H. M., and WEBER, C. L.: Estimation
of deoxyribonucleic acid synthetic period for myelocytes
in dog bone marrow.
Nature 193, 134-135 (1962).
- MAURER, W., PRIMBSCH, E.: Größe der β -Selbstabsorption
bei der 3-H-Autoradiographie.
Exp. Cell Res. 32, 8-18 (1964).
- MAZIA, D.: Mitosis and the physiology of cell division.
In: The Cell, Biochemistry, Physiology, Morphology,
Vol. 3, ed: J. Brachet, A. E. Mirsky, Academic Press,
New York and London, 77-412 (1961).
- MCDONALD, B. B.: Synthesis of deoxyribonucleic acid by
micro- and macronuclei of tetrahymena pyriformis.
J. Cell Biol. 13, 193-203 (1962).
- MORRE, R. C.: Changes in the DNA synthetic period during
the phase of rapid growth in cultured diploid fibro-
plastic cells. Cell Tissue Kinet. 4, 491-500 (1971).
- NOVIKOFF, A. B.: Cell heterogeneity within the hepatic
lobule of the rat. (Staining reactions).
J. Histochem. Cytochem. 7, 240-244 (1959).

- NOVIKOFF, A. B.: Mitochondria (Chondriosomes).
In: The Cell, Vol. II, ed.: J. Brachet, A. E. Mirsky
Academic Press, New York and London 299-421 (1961).
- OEHLERT, W. und BLOCK, P.: Der Mechanismus und zeitliche
Ablauf der reparativen Regeneration in Geweben mit
post- und intermitotischem Zellbestand.
Verh. dtsh. Ges. Path. 46, 333-340 (1962).
- OEHLERT, W. und BUCHNER, T. H.: Mechanismus und zeitlicher
Ablauf der physiologischen Regeneration im mehrschich-
tigen Plattenepithel und in der Schleimhaut des Magen-
Darm-Traktes der weißen Maus.
Beitr. path. Anat. 125, 374-402 (1961).
- OEHLERT, W., HAMMERLING, W. und BUCHNER, F.: Der zeitliche
Ablauf und das Ausmaß der Desoxyribonucleinsäure-
Synthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach
Teilhепatektomie.
Beitr. path. Anat. 126, 91-112 (1962).
- PAINTER, R.B. and DREW, R. M.: Studies on deoxyribonucleic
acid metabolism in human cancer cell cultures (HeLa).
Lab. Invest. 8, 278-285 (1959).
- PAINTER, R. B., SCHAEFER, A. W.: Variation in the rate of
DNA chain growth through the S-phase in HeLa cells.
J. Molec. Biol. 58, 289-295 (1971).
- PEDERSON, T. and GELFANT, S.: G 2-Population cells in mouse
kidney and duodenum and their behavior during the cell
division cycle. Exp. Cell Res. 59, 32-36 (1970).
- PELC, S. R.: Quantitative aspects of autoradiography.
Exp. Cell Res., Suppl. 4, 231-237 (1957).
- PELC, S. R. and APPLETON, T. C.: Distribution of tritiated
thymidine in various tissues.
Nature 205, 1287-1289 (1965).
- PELC, S. R., VIOLA-MAGNI, M. P.: III. Decrease of labeled
DNA in cells of the adrenal medulla after intermittent
exposure to cold. J. Cell Biol. 42, 460-468 (1969).
- PERRY, L. D. and SCHWARTZ, F. J.: Evidence for a subpopula-
tion of cells with an extended G₂-population in normal
adult mouse liver. Exp. Cell Res. 48, 155-157 (1967).
- PETERS, R.: Die Mitosehäufigkeit in der Rattenleber in Ab-
hängigkeit von der Tageszeit, dem Gewicht der Tiere
und der Ernährung. Z. Naturforschg. 17 b, 164-168
(1962 a).

- PETERS, R.: Die Mitoseaktivität in der regenerierenden Leber von Ratten in Abhängigkeit von der Außentemperatur. *Z. Naturforschg.* 17 b, 169-172 (1962 b).
- PILGRIM, Ch., LENNARTZ, K.-J., WEGENER, K., HOLLWEG, S. und MAURER, W.: Autoradiographische Untersuchung über tageszeitliche Schwankungen des 3-H-Index und des Mitoseindex bei Zellarten der ausgewachsenen Maus, des Ratten-Fetus sowie bei Ascites-Tumorzellen. *Z. Zellforschg.* 68, 138-154 (1965).
- PILGRIM, Ch. und MAURER, W.: Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdoppelungszeit verschiedener Zellarten von Maus und Ratte bei Doppelmarkierung mit 3-H- und 14-C-Thymidin. *Naturwiss.* 49, 544-545 (1962).
- PILGRIM, Ch. und MAURER, W.: Autoradiographische Untersuchung über die Konstanz der DNS-Verdopplungsdauer bei Zellarten von Maus und Ratte durch Doppelmarkierung mit 3-H- und 14-C-Thymidin. *Exp. Cell. Res.* 37, 183-199 (1965).
- PONFICK, E.: Experimentelle Beiträge zur Pathologie der Leber. *Virchows Arch. Path. Anat.* 118, 209-249 (1889).
- POST, J. and HOFFMAN, J.: Some effects of tritiated thymidine as a deoxyribonucleic acid label in the rat liver. *Radiation Res.* 14, 713-720 (1961).
- POST, J. and HOFFMAN, J.: Changes in the replication times and patterns of the liver cell during the life of the rat. *Exp. Cell Res.* 36, 111-123 (1964).
- POST, J. and HOFFMAN, J.: Dose-dependent effects of 3-H-TdR as a DNA-label on the replication of liver cells in the growing rat. *Radiation Res.* 26, 422-441 (1965 a).
- POST, J. and HOFFMAN, J.: Further studies on the replication of rat liver cells in vivo. *Exp. Cell Res.* 40, 333-339 (1965 b).
- POST, J. and HOFFMAN, J.: Late effects of 3-H-TdR as a DNA-label on liver cell replication. *Radiation Res.* 30, 748-758 (1967).
- POST, J., HUANG, Ch.-Y. and HOFFMAN, J.: The replication time and pattern of the liver cell in the growing rat. *J. Cell Biol.* 18, 1-12 (1963).
- POST, J., KLEIN, A. and HOFFMAN, J.: Responses of the liver to injury. Effects of age upon the healing pattern after acute carbon tetrachloride. *Arch. Path.* 70, 514-527 (1960).
- PRESCOTT, D. M.: Regulation of cell reproduction. *Cancer Res.* 28, 1815-1820 (1968).
- QUASTLER, H.: The analysis of cell population kinetics. In: *Cell Proliferation (a Guinness Symp.)*, ed.: Lamerton, L. F. and Fry, R.J.M., Blackwell, Oxford, 18-34 (1963).

- QUASTLER, H. and SHERMAN, F. G.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse.
Exp. Cell Res. 17, 420-438 (1959).
- RABES, H.: Untersuchungen zur humoralen Regulation bei regenerativem und malignem Wachstum.
Veröffentlichungen aus der morphologischen Pathologie 73, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1967).
- RABES, H.: Beeinflussung der Proliferationsaktivität normaler und maligner Gewebe durch Hypophysektomie.
Z. Krebsforschung 72, 176-184 (1969).
- RABES, H. und BRÄNDLE, H.: Beziehungen zwischen RNS- und DNS-Synthese bei der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 1, 317-322 (1968).
- RABES, H. and BRÄNDLE, H.: Synthesis of RNA, protein, and DNA in the liver of normal and hypophysectomized rats after partial hepatectomy.
Cancer Res. 29, 817-822 (1969).
- RABES, H., HARTENSTEIN, R. and SCHOLZE, P.: Hemmung der Proliferationsaktivität partiell resezierter Leber durch Däthylnitrosamin.
Z. Krebsforschung 73, 239-241 (1970).
- RABES, H. und JANTSCH, B.: Proliferationskinetik der Hepatocyten in primären Leberkulturen.
Z. Zellforsch. 112, 414-429 (1971).
- RABES, H. und TUCZEK, H. V.: Topik der DNS-Synthese nach Teilhepatektomie. Naturwiss. 54, 229-230 (1967).
- RABES, H. und TUCZEK, H. V.: Topik der Leberregeneration nach Teilhepatektomie bei Allylformiat-vergifteten Ratten (Demonstration).
Verh. dtsch. Ges. Path. 52, 449-452 (1968).
- RABES, H. und TUCZEK, H. V.: Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 6, 302-312 (1970).
- RABES, H. und TUCZEK, H. V.: Zellproliferation in der partiell resezierten Rattenleber nach akuter Intoxikation durch Allylformiat.
Beitr. Path. Anat. 142, 14-28 (1971).
- RABES, H., TUCZEK, H. V. und BRÄNDLE, H.: Allylformiatvergiftung bei experimentell ausgelöster Leberregeneration. Klin. Wschr. 46. Jahrg. 8, 450-451 (1968).

- RABES, H., WIRSCHING, R., TUCZEK, H. V.: Dauer des Leberzellzyklus nach partieller Hepatektomie. Naturwiss. 59, 221-222 (1972).
- RABES, H., WRBA, H. and BRÄNDLE, H.: Synthesis of deoxyribonucleic acid in the liver of hypophysectomized rats after partial hepatectomy. Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 120, 244-246 (1965).
- RABES, H., WRBA, H., EDER, M. und BRÄNDLE, H.: DNS-Synthese und Cytoplasma-Veränderungen bei der Leberregeneration nach Hypophysectomie. Z. Naturforschg. 20 b, 607-608 (1965).
- RAPPAPORT, A. M., BOROWY, A. J., LOUGHEED, W. M. and LOTTO, W. N.: Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Anat. Rec. 119, 11-33 (1954).
- RAPPAPORT, A. M.: Acinar units and the pathophysiology of the liver. In: The Liver, Morphology, Biochemistry, Physiology. Vol. I, ed.: Ch. Rouiller, Academic Press, New York, London 265-328 (1963).
- RAJEWSKI, M. F., HÜLSER, D. F., FABRICIUS, E.: Untersuchungen zur Synchronisation in vivo: Temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff in normalen und malignen Säugerzellsystemen. Z. Krebsforsch. 76, 266-292 (1971).
- REICHARD, P. and ESTBORN, B.: Utilization of desoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. J. biol. Chem. 188, 839-846 (1951).
- ROBINSON, S. H. and BRECHER, G.: Delayed incorporation of tritiated thymidine into DNA. Science 142, 392-393 (1963).
- RUBINI, J. R., CRONKITE, E. P., BOND, V. P. and FLIEDNER, T. M.: The metabolism and fate of tritiated thymidine in man. J. clin. Invest. 39, 909-918 (1960).
- RUSSO, J., ECHAVE LLANOS, J. M.: Twenty-four-hour rhythm in the mitotic activity and in the water and dry matter content of regenerating liver. Z. Zellforsch. 1, 824-828 (1964).
- SAWICKI, W., BLATON, O., ROWINSKI, J.: Correction of autoradiographic grain count in respect to precisely calculated background. Histochem. 26, 67-73 (1971).
- SCHAER, J. C., RAMSEIER, L. and SCHINDLER, R.: Studies on the division cycle of mammalian cells. IV. Incorporation of labeled precursors into DNA of synchronously dividing cells in culture. Exp. Cell Res. 65, 17-22 (1971).

- SCHMEER, A. C., SCHULTZE, B., MAURER, W.: Eine verbesserte Methode zur autoradiographischen Bestimmung von Generationszeiten. *Naturwiss.* 58, 100 (1971).
- SCHUHMACHER, H.: Die Durchblutung der Leber und ihre Bedeutung für die funktionelle Heterotopie des Organparenchyms. *Klin. Wschr.* 38, 1011-1012 (1960).
- SCHULTZE, B.: Die Orthologie und Pathologie des Nukleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm. In: *Handbuch der allg. Pathologie* II/5, 466-670 Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1968).
- SCHLUTZE, B., HAACK, V., SCHMEER, A. C. and MAURER, W.: Autoradiographic investigation on the cell kinetics of crypt epithelia in the jejunum of the mouse. Confirmation of steady state growth with constant frequency distribution of cells throughout the cycle. *Cell Tissue Kinet.* 5, 131-145 (1972).
- SCHULTZE, B., OEHLERT, W.: Autoradiographic investigation of incorporation of 3-H-Thymidine into cells of the rat and mouse. *Science*, 131, 737-738 (1960).
- SCHULTZE, B., MAURER, W.: Studies on cell proliferation of liver epithelia in 3-week-old rats. *J. of Microscopy* 96, 219-225 (1972).
- SHACKNEY, S. E., FORD, S. S., WITTIG, A. B.: The effects of counting threshold and emulsion exposure duration on the percent-labeled mitosis curve and their implication for cell cycle analysis. *Cancer Res.* 33, 2726-2731 (1973).
- SISKEN, I. E.: Quantitative studies of the mitotic cycle. In: *The Proliferation and Spread of Neoplastic Cells, Twenty-first Annual Symposium on Fundamental Cancer Research*, 159-174 (1967), The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1968).
- SISKEN, I. E. and MORASCA, L.: Intrapopulation kinetics of the mitotic cycle. *J. Cell Biol.* 25, 179-189 (1965).
- SISKEN, I. E., MORASCA, L. and KIBBY, S.: Effects of temperature on the kinetics of the mitotic cycle of mammalian cells in culture. *Exp. Cell Res.* 39, 103-116 (1965).
- SORDAT, M., SORDAT, B., COTTIER, H., HESS, M. W., RIEDWYL, H., CHANANA, A., and CRONKITE, E. P.: Studies on lymphocytes. XV. Analysis of the in vivo division cycle of large lymphoid cells in calf thoracic duct using combined microspectrophotometry and autoradiography. *Exp. Cell Res.* 70, 145-153 (1972).

- STANNERS, C. P. and TILL, J. E.: DNA-synthesis in individual L-strain mouse cells.
Biochem. Biophys. Acta 37, 406-419 (1960).
- STAROSCIK, R. N., JENKINS, W. H. and MENDELSON, M. L.: Availability of tritiated thymidine after intervenous administration. Nature 202, 456-458 (1964).
- STEEL, G. G.: The turnover of tritiated thymidine as a source of information on the kinetics of cell populations. In: Cell Proliferation, ed.: Lamerton, L. F. and Fry, R.J.M., Blackwell Sci. Publ., Oxford 37-57 (1963).
- STEEL, G. G.: The cell cycle in tumors: an examination of data gained by the technique of labeled mitoses. Cell Tissue Kinet. 5, 87-100 (1972).
- STEEL, G. G. and HAINES, S.: The technique of labeled mitosis: analysis by automatic curve-fitting. Cell Tissue Kinet. 4, 95-105 (1971).
- STEEL, G. G., LAMERTON, L. F.: The turnover of tritium from thymidine in tissues of the rat. Exp. Cell Res. 37, 117-131 (1965).
- STÖCKER, E.: Der Proliferationsmodus in Niere und Leber. Verh. d. Dtsch. Ges. f. Pathol. 50, 53-74 (1966).
- STÖCKER, E.: Growth and regeneration in parenchymatous organs of the rat. 2. Meeting of the European Study Group for Cell Proliferation. Abstr. Papers, 80-82 (1968 a).
- STÖCKER, E.: Autoradiographische Untersuchungen zum zellulären Proliferationsstoffwechsel im Parenchym von Leber und Niere der Ratte. Acta histochemica, Supplementband, 8, 205-229 (1968 b).
- STÖCKER, E. und ALTMANN, H. W.: Die DNS-Synthese in Leberparenchymzellen und Gallengangsepithelien von normalen und mit Thioacetamid behandelten Ratten. Naturwiss. 51, 15 (1964).
- STÖCKER, E. und BACH, G.: Zur Proliferation und DNS-Syntheserate des Leberparenchyms nach Teilhepatektomie. Autoradiographische Untersuchungen mit 3-H-Thymidin. Naturwiss. 52, 264-265 (1965).
- STÖCKER, E. und HEINE, W.-D.: Zum initialen Mitosegipfel in Tubulusepithelien nach Ischämie der kontralateralen Niere (Autoradiographische Untersuchungen mit 3-H-Thymidin. Naturwiss. 52, 212 (1965 a).

- STOCKER, E. und HEINE, W.-D.: Über die Proliferation von Nieren- und Leberepithel unter normalen und pathologischen Bedingungen. Autoradiographische Untersuchungen mit 3-H-Thymidin an der Ratte. Beitr. Path. Anat. 131, 410-434 (1965 b).
- STOCKER, E. und HEINE, W.-D.: Proliferation und Regeneration in Leber und Niere der juvenilen Ratte. Autoradiographische Untersuchungen nach 3-H-Thymidin-Dauerinfusion. Verh. Dtsch. Ges. Path. 55, 483-488 (1971 a).
- STÖCKER, E. und HEINE, W.-D.: Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. Beitr. Path. Bd. 144, 400-408 (1971 b).
- STÖCKER, E. und PFEIFER, U.: Autoradiographische Untersuchungen mit 3-H-Thymidin an der regenerierenden Rattenleber. Z. Zellforsch. 79, 374-388 (1967).
- STÖCKER, E., LIEBSCHER, W., ALTMANN, H.-W.: Zum Proliferations-Stoffwechsel der Rattenleber nach Teilhepatektomie. Autoradiographische Untersuchungen mit 3-H-Cytidin, -Phenylalanin und -Thymidin. Experientia 23, 718-719 (1967).
- STÖCKER, E., SCHULTZE, B., HEINE, W.-D. und LIEBSCHER, H.: Wachstum und Regeneration in parenchymatösen Organen der Ratte. Autoradiographische Untersuchung mit 3-H-Thymidin. Z. Zellforsch. 125, 306-331 (1972).
- STOCKER, E., TLUBNER, E. und ROSENBERG, G.: Die DNS-Synthese als Funktion des Alters in Leber und Niere der Ratte. Verh. Dtsch. Ges. Path. 48, 295-299 (1964).
- STONE, G. E., MILLER, O. L. and PRESCOTT, D. M.: H-3-thymidine derivate pools in relation to macronuclear DNA-synthesis in tetrahymena pyriformis. J. Cell Biol. 25, 171-177 (1965).
- SULKIN, N. M.: A study of the nucleus in the normal and hyperplastic liver of the rat. Amer. J. Anat. 73, 107-125 (1943).
- TAKAHASHI, M.: Theoretical basis for cell cycle analysis. J. theoret. Biol. 13, 202-211 (1966).
- TAKAHASHI, M., HOGG, I. D. and MENDELSON, M. L.: The automatic analysis of FLM-curves. Cell Tissue Kinet. 4, 505-518 (1971).
- TANNOCK, I. F.: The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumor. Brit. J. Cancer 22, 258-273 (1968).

- TANNOCK, I. F.: A comparison of cell proliferation parameters in solid and ascites Ehrlich tumors.
Cancer Res. 29, 1527-1534 (1969).
- TANNOCK, I. F.: Population kinetics of carcinoma cells, capillary endothelial cells, and fibroblasts in a transplanted mouse mammary tumor.
Cancer Res. 30, 2470-2476 (1970).
- TONNA, E. A. and CRONKITE, E. P.: Factors which influence the latent image in autoradiography.
Stain Technol. 33, 255-260 (1958).
- TUCZEK, H.-V.: Autoradiographische Untersuchungen zur Topik der RNA- und DNA-Synthese in der regenerierenden Leber. Inaugural-Dissertation, München 1970.
- TUCZEK, H.-V. und RABES, H.: Verlust der Proliferationsfähigkeit der Hepatocyten nach subtotaler Hepatektomie.
Experientia 27, 526 (1971).
- TUCZEK, H.-V. und RABES, H.: Intralobuläre Differenzen der nucleären Cytidin-5- β -H-Inkorporation nach partieller Hepatektomie. Autoradiographische Untersuchung.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 10, 263-267 (1972).
- TUCZEK, H.-V. und RABES, H.: Autoradiographische und biochemische Untersuchungen zum Übertritt der Hepatocyten von der G 1 in die S-Phase nach partieller Hepatektomie.
Z. Zellforsch. 142, 399-406 (1973).
- VIOLA-MAGNI, M. P.: A radioautographic study with 3-H-thymidine on adrenal medulla nuclei of rats intermittently exposed to cold. J. Cell.Biol. 28, 9-19 (1966).
- WACHSTEIN, M.: Enzymatic histochemistry of the liver.
Gastroenterology 37, 525-557 (1959).
- WACHSTEIN, M.: Cyto- and histochemistry of the liver.
In: The Liver, Vol. I, ed: C. H. Rouiller
Acad. Press, New York and London, 137-194 (1963).
- WALKER, P.M.B., YATES, E. B.: Nuclear components of dividing cells. Proc. roy. Soc. B. 140, 274-299 (1952).
- WAND, M., ZEUTHEN, E., EVANS, E. A.: Tritiated thymidine: effects of decomposition by self-radiolysis on specificity as a tracer for DNA-synthesis.
Science 157, 436-438 (1967).
- WEGENER, K. HOLLWEG, S. und MAURER, W.: Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdoppelungszeit und anderer Teilphasen des Zell-Zyklus bei fetalen Zellarten der Ratte.
Z. Zellforsch. 63, 309-326 (1964).

- WIMBER, D. E.: Methods for studying cell proliferation with emphasis on DNA labels.
In: Cell proliferation, ed: Lamerton, L. F. and Fry, R.J.M., Blackwell, Oxford, 1-17 (1963).
- WIMBER, D. E. and QUASTLER, H.: A 14-C- and 3-H-thymidine double labelling technique in the study of cell proliferation in tradescantia root tips.
Exp. Cell Res. 30, 8-22 (1963).
- YOUNG, R. W.: Regional differences in cell generation time in growing rat tibiae.
Exp. Cell Res. 26, 562-567 (1962).
- ZETTERBERG, A. and KILLANDER, D.: Quantitative cytochemical studies on interphase growth. II.
Exp. Cell Res. 32, 22-32 (1965).

L e b e n s l a u f

Am 6. Oktober 1946 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. Paul Wirsching und seiner Ehefrau Lore, geborene Seibt, in Haag/Oberbayern geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule in Buchbach und Mühldorf, anschließend in Mühldorf das Ruperti-Gymnasium, wo ich im Juli 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1966 begann ich das Medizinstudium an der Ludwigs-Maximilians-Universität, wo ich im Oktober 1967 die naturwissenschaftliche und im April 1969 die ärztliche Vorprüfung bestand. Danach wechselte ich an die II. Medizinische Fakultät der Technischen Universität München, an der ich im Juli 1972 mit dem medizinischen Staatsexamen mein Studium abschloß.

Als Medizinalassistent war ich am Pathologischen Institut der Universität München, der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Garmisch-Partenkirchen und der II. Medizinischen Klinik der Technischen Universität München tätig.

